creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000267164

2019년 2월
석사학위논문

모링가 잎 추출물의 phytochemical 분석 및 항산화, 항비만 효능 평가

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

김 다 송

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

모링가 잎 추출물의 phytochemical 분석 및 항산화, 항비만 효능 평가

Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antiobesity Effects of *Moringa oleifera* Leaves Extracts

2019년 2월 25일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

김 다 송

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

모링가 잎 추출물의 phytochemical 분석 및 항산화, 항비만 효능 평가

지 도 교 수 신 현 재

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2 0 1 8 년 1 0 월

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

김 다 송

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김다송의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 이중헌 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이재욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 신현재 (인)

2 0 1 8 년 1 1 월

조 선 대 학 교 대 학 원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Contents

List of Tables ····· **IV**

List of Figures ····· **V**

ABSTRACT ····· **Ⅵ**

제1장 서론 ····· **1**

1. 연구의 배경 ····· 1

가. 모링가 (*Moringa oleifera*) ····· 1

나. 폴리페놀 (polyphenol) ····· 2

다. 아이소싸이오사이아네이트 (isothiocyanate) ····· 6

라. 항산화 (antioxidant) ····· 8

마. 항비만 (antiobesity) ····· 13

2. 연구동향 및 구성 ····· 15

가. 연구동향 ····· 15

나. 연구의 구성 ····· 18

제2장 모링가 잎 추출물의 phytochemical 분석 ····· **20**

1. 재료 및 방법 ····· 20

가. 모링가 잎 추출 ····· 20

나. 폴리페놀 함유량 분석 ····· 22

다. 아이소싸이오사이아네이트 함유량 분석 ····· 22

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 실험결과 및 토의 ····· 23
가. 모링가 잎 추출 수율 ····· 23
나. 폴리페놀 함유량 분석 ····· 25
다. 아이소싸이오사이아네이트 함유량 분석 ····· 29

제3장 모링가 잎 추출물의 항산화 효능 ····· 30
1. 재료 및 방법 ····· 30
가. ABTS radical scavenging ····· 30
나. DPPH radical scavenging ····· 30
다. SOD-like activity ····· 30
2. 실험결과 및 토의 ····· 32
가. ABTS radical scavenging ····· 32
나. DPPH radical scavenging ····· 33
다. SOD-like activity ····· 34

제4장 모링가 잎 추출물의 항비만 효능 ····· 36
1. 재료 및 방법 ····· 36
가. 효소 활성 저해 ····· 36
나. 3T3-L1 cell ····· 36

2. 실험결과 및 토의 ····· 38
가. 효소 활성 저해 ····· 38
나. 3T3-L1 cell ····· 41

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제5장 결론 ····· 46

References ····· 48

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table 1. Antioxidant activities of M. oleifera leaves extracts depending on extraction method, assay and cultivated county ····· 16

Table 2. Abbreviations of M. oleifera extracts sample ····· 21

Table 3. Phytochemical anyalysis data of *M. oleifera* extracts using HPLC ···· 28

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Figure 1. Classification of polyphenols. ····· 4

Figure 2. Chemical structure of the different classes of flavonoids. ····· 5

Figure 3. Mechanism of glucosinolate hydrolysis by myrosinase. ····· 7

Figure 4. Schematic of experiments depending on extraction method, phytoche mical analysis, antioxidant and antiobesity effect. ····· 19

Figure 5. Yields of *M. oleifera* extracts. ····· 24

Figure 6. Total polyphenol contents in *M. oleifera* extracts. ····· 26

Figure 7. IC_{50} values of antioxidant assay results. (A) ABTS radical scavenging (B) DPPH radical scavenging (C) SOD-like activity ····· 35

Figure 8. Enzyme inhibition assay. (A) α-Glucosidase inhibtion (B) Lipase inhibition. ····· 40

Figure 9. Morphology of 3T3-L1 cell treated with *M. oleifera* extracts. ····· 43

Figure 10. Western blot images of effect of *M. oleifera* extracts on different transcriptional factors. (A) C/EBPα, (B) PPARɣ, (C) FAS, (D) ACC. ····· 45

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antiobesity Effects of *Moringa oleifera* Leaves Extracts

Kim, Da-Song

Advisor: Prof. Hyun-Jae Shin, Ph.D.

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

Moringa oleifera (common names of moringa or drumstick tree) is native to tropical and subtropical regions of South Asia. While, its cultivation is actively being carried out in South Korea due to recent climate change. *M. oleifera* is rich in nutrients such as proteins, vitamins, minerals, and phytochemicals, and has been used as a traditional remedy for a variety of physiological activities. The leaves can be used in many ways from food and feed to traditional medicine and research. Phytochemicals differ in composition and content depending on the cultivation environment and extraction method of the raw materials. Therefore, the phytochemical composition and antioxidant activities of *M. oleifera* leaves extracts were needed.

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are caused by endogenous factors such as metabolism in the body or exogenous factors such as drinking and smoking. ROS and RNS are eliminated by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) present in the body. When the content of ROS and RNS is higher than that of antioxidant, redox balance is decreased resulting in oxidative stress and cell destruction. The metabolic diseases such as diabetes, obesity and hypertension

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

could be developed by the oxidative stress. When obesity develops, the adipocyte differentiates and secretes hormones such as adipokines leptin and adiponectin. Antioxidant activity of *M. oleifera* leaves extract has been studied through various mechanisms. Recently, antiobesity activity has been confirmed by administration of *M. oleifera* leaves extract to rats, but other mechanisms are unclear. Therefore, in this study, ABTS radical scavenging, DPPH radical scavenging and SOD-like activity were measured to examine the antioxidant activity of *M. oleifera* leaves extract.

Domestic *M. oleifera* leaves were extracted with hot water (DW) and alcohol extracts (DEE), and foreign *M. oleifera* leaves were extracted with hot water (OW) and alcohol (OEE). The alcohol extracts were partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate (EtOAc), and the fraction of EtOAc was used for the experiment. The yield of the extract was 20.48% ~ 28.26%. As a result of HPLC analysis, gallic acid, caffeic acid, rutin and p-coumaric acid were contained in common hot water extract and alcohol extract, and quercetin and sulforaphane were found to be contained in alcohol extract. The antioxidant activities of DEE, OEE, DW and OW were higher than that of hot water extract (DW, OW). DPPH radical scavenging was higher in the order of OEE, DEE, OW, and DW. SOD-like activities were higher in order of DEE, OEE, OW and DW, and the extracts of DEE and OEE were much higher than those of hot water extract (DW, OW). To examine the anti-obesity activity, *in vitro* α-glucosidase and lipase inhibitory activities were measured. Using 3T3-L1 cells, C/EBPα and PPARɣ, which are involved in adipocyte differentiation, Of FAS and ACC were confirmed by western blot. α-Glucosidase inhibitory activity, OEE, DEE, DW, and OW showed higher inhibitory activity, and OEE and DEE inhibitory activities were higher than acarbose, a positive control of the same concentration. Lipase inhibitory activity was measured by OEE, DEE, OW, and DW. The inhibitory activity of OEE was about three times lower than that of the positive control, orilstat, but lipase inhibitory activity was confirmed. Oil red O staining revealed that moringa leaf extract inhibited the accumulation of triglyceride in a concentration-dependent manner in 3T3-L1 cells. In addition, the expression of C/EBPα

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

involved in 3T3-L1 cell differentiation did not have a concentration-dependent inhibitory effect on the moringa leaf extract. However, the expression of FAS and ACC, which are involved in the synthesis of PPARɣ and fatty acids involved in cell differentiation, was inhibited by the concentration of the leaf extract and the extract of hot water (DEE, OEE).

These results suggest that the extract of *M. oleifera* leaves contains a substantial amount of phytochemicals and has antioxidant and antiobesity activity and may be used as a functional food in near future.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제1장 서론

1. 연구의 배경

가. 모링가 (*Moringa oleifera*)

모링가 (*Moringa oleifera*)는 높이가 5~10 m에 이르는 나무로 열대지방 또는 아열대지방에서 재배되며, 강수량이 적은 환경에서도 잘 자라 전 세계적으로 재배되고 있다 [1]. 최근 우리나라의 기후변화로 인하여 전라도 및 경상도 지역을 중심으로 재배되고 있으며, 음료 및 에너지바 등 건강기능식품으로 개발되고 있다. 또한 모링가는 단백질, 미네랄, 비타민 등이 풍부해 영양가가 높고, 다량의 phytochemical이 함유되어 있어 항당뇨, 항염, 항암 등 다양한 약리작용을 가지고 있다 [2, 3]. 잎과 꽃, 꼬투리는 채소로 이용되며, 모링가의 뿌리는 필리핀에서 서양 고추냉이 대체용으로 사용된다. 또한 씨앗은 오일을 추출하는데 활용되고 유럽 시장에서 높은 점유율을 가지고 있으며, 통증 및 염증과 관련된 다양한 질병에 민간요법으로 사용되어 왔다 [4]. 특히 모링가의 잎은 다른 식물에 비해 영양분과 phytochemical이 풍부한 것으로 알려져 있으며 피부 염증이나 피부 상처 치유에 효과가 있다는 보고가 있다 [5]. 모링가 잎은 주로 차로 활용되며 개발도상국에서는 영양보충제로 섭취하고, 동물 사료로도 활용된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 폴리페놀 (polyphenol)

폴리페놀은 야채나 과일에 다량 함유되어 있으며, 질병을 예방하는 물질로 알려져 있다 [6, 7]. Fig. 1과 같이 폴리페놀은 크게 플라보노이드 (flavonoid), 페놀릭 에시드 (phenolic acid), 리그난 (lignan) 및 스틸벤 (stilbene)으로 분류할 수 있다 [8]. 폴리페놀은 주로 항산화 활성을 띄는데 이는 화학적으로 폴리페놀 분자 내에 전자 풍부하여 hydrogen donating이 발생하여도 안정한 분자 구조를 이루기 때문이다. 폴리페놀이 항산화 물질로서 작용하려면 기질보다는 낮은 농도로 존재해야 하고, radical 소거 후에 분자 내의 수소결합이 안정해야한다 [9].

플라보노이드는 기본적으로 C6-C3-C6의 구조로 15개의 탄소 원자를 가지고 있다. 두 개의 aromatic ring인 A와 B로 이루어져 있으며, heterocylic ring인 C가 A와 B를 3개의 탄소로 이어주고 있다 (Fig. 2). Aromatic ring A는 acetate/malonate pathway로부터 생성되고, aromatic ring B는 shikimate pathyway의 phenylalanine으로부터 생성된다. Heterocylic ring C의 치환 패턴에 따라서 플라보노이드가 플라바논 (flavanone), 플라본 (flavone), 아이소플라본 (isoflavone), 플라보놀 (flavonol), 안토시아니딘 (anthocyanidin)으로 분류된다. Ring A와 B가 치환되기도 하는데, 이는 플라보노이드의 분자 구조의 다양성을 보여주며, 치환될 때 oxygenation, alkylation, gly-cosylation, acylation, sulphonation 반응 등이 일어난다. 플라보노이드는 높은 산화 환원 전위를 가지고 있어, 환원제, 수소 공여체 역할을 할 수 있다. 플라바논은 포화 상태 3개의 탄소 사슬 및 C4에 산소 원자가 있다. 플라바논은 일반적으로 C7에서 이당류에 의해 glycosylation되며, 감귤류에서 높은 농도로 존재하며 토마토와 민트와 같은 향기를 가진 식물에 존재한다. 플라본은 적색, 자주색의 과일과 채소에 많이 함유되어 있다. 플라본은 생리활성이 없고, 체내에서 잘 흡수되지 않고 빠르게 배출된다. 아이소플라본은 플라보노이드 Ring B의 C3 위치에 Ring C가 결합되어 있는 구조이다. 에스트로겐 (estrogen)과 구조적으로 유사하고 주로 콩에 많이 함유되어 있다. 플라보놀 은 빛에 자극을 받아 합성을 하며, 같은 식물이라도 자라는 환경에 따라서 함유량의 차이가 많이 발생한다. 플라보놀의 성분으로는 캠프페럴 (Kaempferol)과 큐어세틴 (quercetin)이 플라보놀이 대표적이며, 이와 같은 성분들은 자연계에 다량으로 존재하는 유비퀴논 폴리페놀이라고 할 수 있다. 안토시아니딘은 적색, 청색 및 자주색을 나타내는 주요 성분이며 흑미에 많이 존재하고 주로 glycosidic 구조를 가진다. 안토시아니딘은 주로 산성 용액에서 안정하며, 산성 용액에서는 적색을 띠

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

며 염기성 용액에서는 청색을 띤다. 이러한 플라보노이드는 reducing agents, hydrogen donating antioxidants, singlet oxygen quenchers, metal chelation의 특성을 가지고 있다 [10]. 대부분의 플라본과 플라보놀은 320~385 nm 또는 250~285 nm에서 UV-VIS 최대 흡광값을 가지는데, 이는 A와 B ring의 흡수 파장대이다. Hydroxyl group이 증가할수록 최대 흡수 파장대는 증가한다. 플라바논은 포화된 heterocyclic C ring이 존재하는데, 이는 A 와 B ring 사이에서 conjugation을 감소시켜, 플라본과 플라보놀에 비하면 UV-VIS 흡수 파장대가 낮고, 항산화 활성 또한 낮다. C ring이 불포화 상태이면 항산화 활성이 높으며 라디칼과 반응 시 전자 비편재화를 통하여 라디칼을 안정화한다.

폴리페놀의 한 종류인 페놀릭 에시드는 dietary phenol의 1/3을 차지하며, phenol과 ester, ether, acetal 결합을 형성하여 다양한 형태로 존재한다. 페놀릭 에시드 (phenolic acid)는 non-flavonoid polyphenolic compound이며, 크게 벤조익 산 (benzoic acid)와 시나믹 산 (cinnamic acid)으로 나눌 수 있다. 벤조산은 C1-C6, cinnamic acid는 C3-C6 구조를 가지고 있다. 대표적인 페놀릭산인 갈산 (gallic acid)은 분자 내에 3개의 hydroxyl 그룹이 존재하여 라디칼 (radical)에 의하여 산화되어도 새로운 hydrogen bonding을 형성하여 안정한 구조를 가지게 된다. 이와 같이 폴리페놀 내에 hydroxyl 기의 수가 증가할수록 항산화 활성도 증가한다. 또한 hydroxyl 기의 위치에 따라서 항산화 활성이 변화하며, 폴리페놀 분자 내의 hydroxyl 그룹의 수와 위치는 항산화 활성에 매우 중요한 역할을 한다[11, 12].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

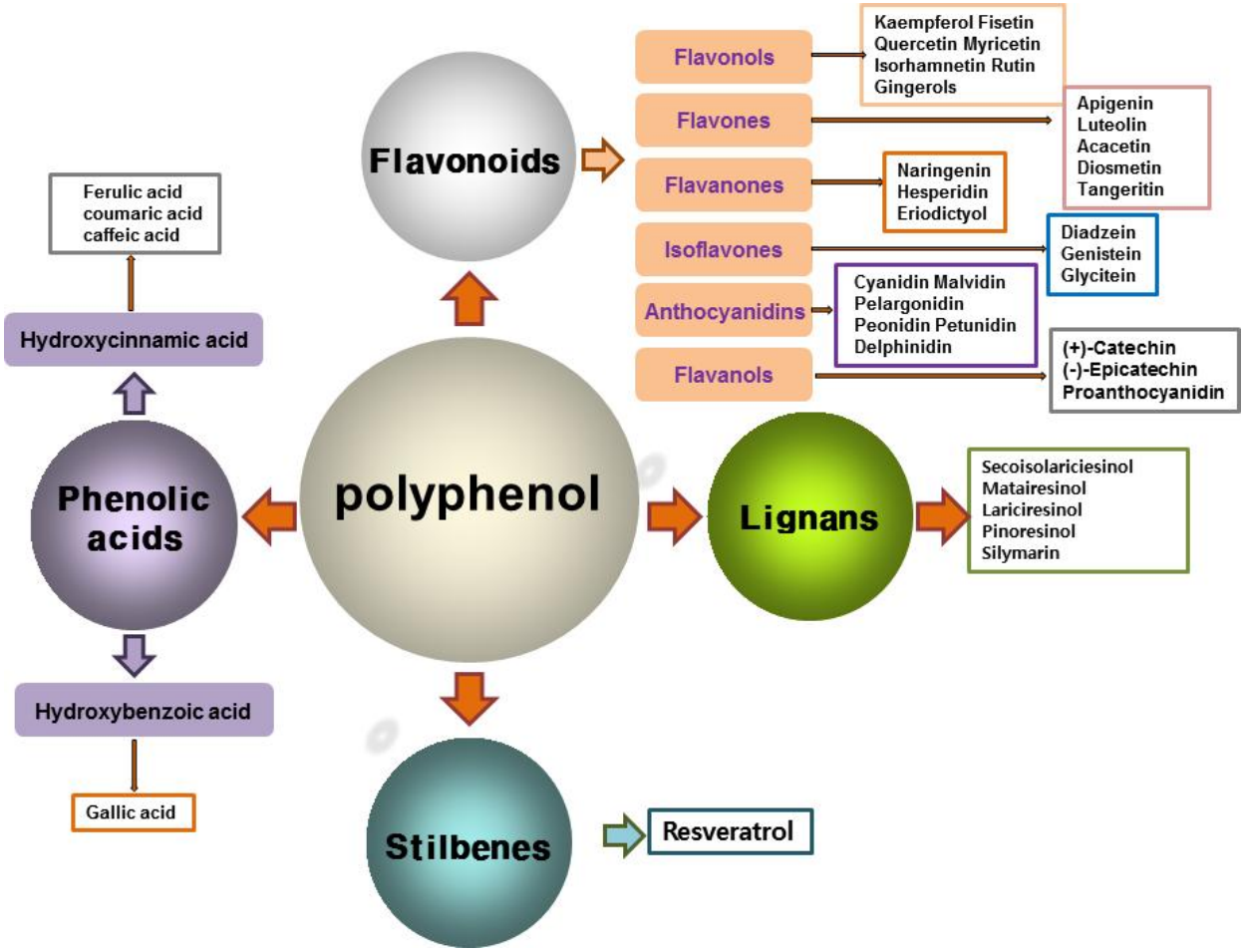


Figure 1. Classification of polyphenols [8].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

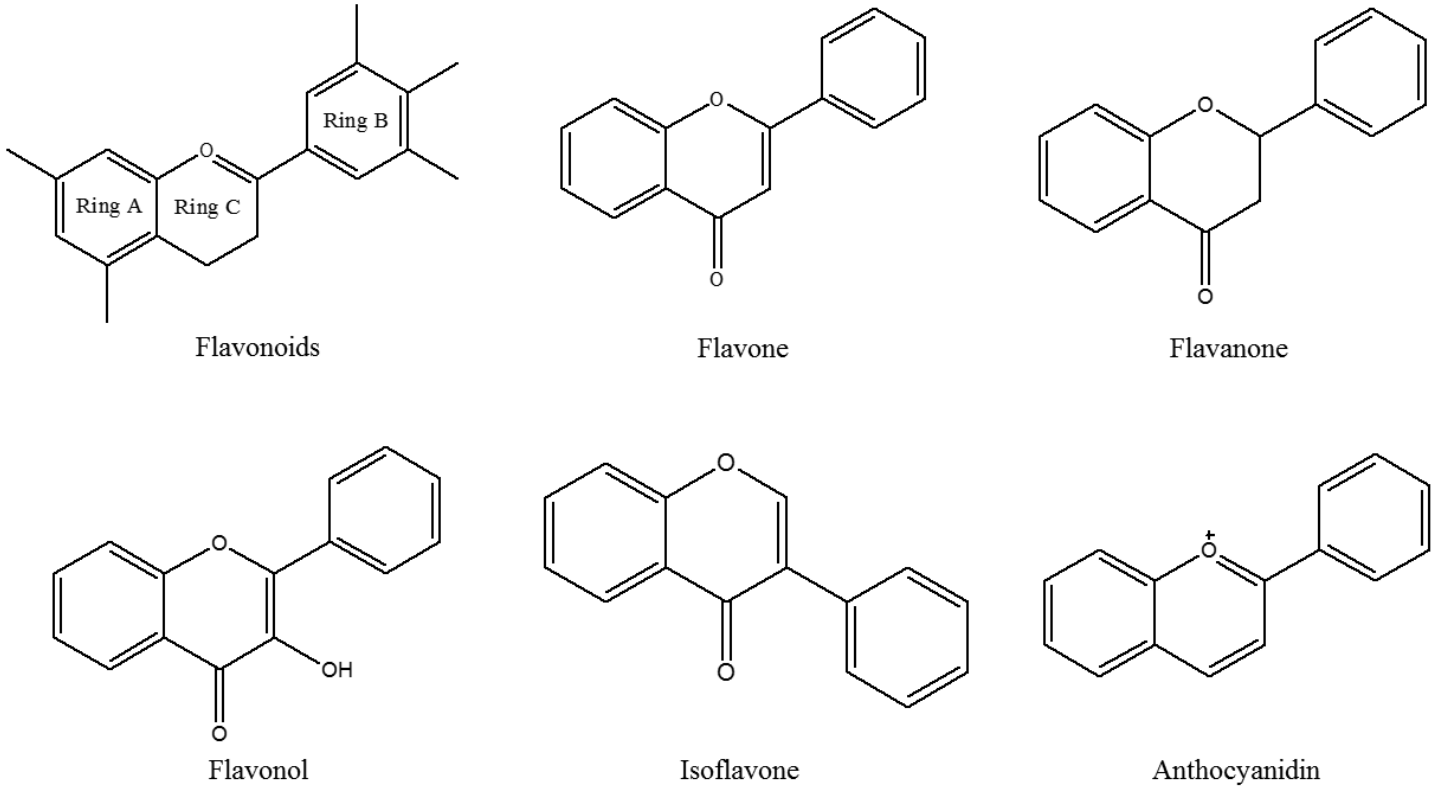


Figure 2. Chemical structure of the different classes of flavonoids.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 아이소싸이오사이아네이트 (isothiocyanate)

식물은 보통 glucosinolate를 생산하며, 이는 곤충이나 동물로부터 자신들을 보호하는 역할을 하는데 이와같은 식물들은 family가 *Moringaceae*, *Caricaceae*, *Mustard*에 속한다[13]. 이러한 식물은 외부에서 자극이 주어지면 myrosinase를 분비하여 glucosinolate를 glucose와 아이소싸이오사이아네이트 (isothiocyanate)로 분해한다 [14]. 이 때 생성되는 아이소싸이오사이아네이트는 맛이 맵고 화학적으로 반응성이 강하여, 곤충이나 동물들에게 위협적인 물질이다 [15].

Thio는 sulfur 원자를 의미하며, cyanate는 carbon 원자와 nitron 원자가 결합되어 있는 것을 의미하며, 일반적으로 R-N=C=S로 나타낸다. glucosinolate가 함유된 대표적인 식물로 고추냉이, 겨자, 파파야 씨앗 등이 있다. 이를 분쇄하여 가루로 섭취하면 외부의 자극에 의하여 glucosinolate가 아이소싸이오사이아네이트로 분해되어 매운 맛과 쓴 맛을 가지고 있으며, 항염 및 항암 활성이 있다 [16, 17].

모링가 잎은 glucosinolate의 종류인 glucomoringin, glucotropaeolin, 3-Hydroxy-4-(α-L-rhamnopyranosyloxy)benzyl glucosinolate 등을 함유하고 있어, 쓴 맛을 가지고 있다. Maldini 등 (2014)은 모링가 잎 100g에 77.7±8.07mg glucomoringin, 15.66±1.04mg glucotropaelin을 함유하고 있다고 하였다 [18]. 또한, glucomoringin이 myrosinase에 의하여 분해되면 아이소싸이오사이아네이트인 sulforaphane이 형성된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

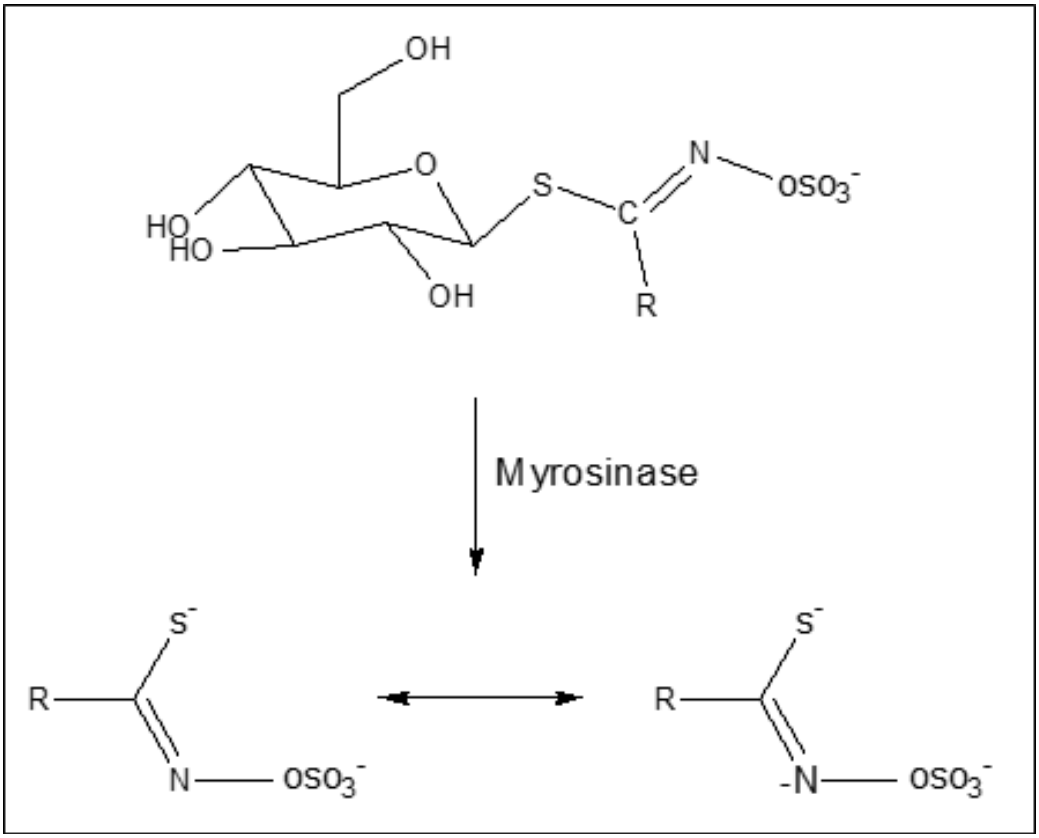


Figure 3. Mechanism of glucosinolate hydrolysis by myrosinase.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 항산화 (antioxidant)

A. 항산화

체내에서 생성되는 reactive oxgen species (ROS) 또는 reactive nitrogen species (RNS)로부터 세포 손상이 발생하는 과정을 지연 또는 방어하는 물질을 항산화 물질이라고 한다 [19, 20]. ROS나 RNS로부터 세포를 보호하기 위하여 체내에서도 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), gluthione reductase (GRD), uric acid, bilirubin, albumin, metallothioneins 등이 분비되며, 이를 내재성 (endogenous) 항산화 물질이라고 한다 [21]. 하지만 내재성 항산화 물질로만 ROS와 RNS을 소거할 수 없어 비타민, 카로틴, 폴리페놀 등의 외재성 (exogenous) 항산화 물질 섭취가 필요하다. ROS와 RNS의 함량이 항산화 물질보다 높아지면 산화 스트레스 (oxidative stress)가 발생해 세포가 파괴되어 비만, 당뇨, 암 등과 같은 질병이 발생한다. 따라서 ROS와 RNS를 소거시키는 것이 가장 중요하며, 외재성 항산화 물질의 섭취는 필수적이다 [22].

B. 항산화 활성 분석

1) 항산화 활성 분석의 일반사항

In vitro 실험으로 항산화 활성을 측정할 경우는 인위적으로 라디칼을 발생시켜 항산화 물질과 반응한다. 라디칼 소거능을 UV-vis 등과 같은 방법으로 활성을 측정한다. 항산화 활성 분석 시 사용되는 라디칼은 크게 자유 라디칼, 산소 라디칼으로 분류된다. 또한, 금속 chelation 정도로 항산화 활성을 측정하기도 한다. Fe^{2+}, Ca^{2+} 등과 같은 금속이온은 지질산화반응에서 촉매의 역할을 해 체내에서 산화반응을 발생시키며, 이러한 과정에서 라디칼이 생성되어 세포 손상을 발생한다. 그러나 항산화 활성이 있는 항산화 물질이 금속이온과 chelation되면 촉매가 제거되어 지질산화반응이 저해된다 [23].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2) 자유 라디칼

가) DPPH radical scavenging activity

1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 분자 내에서 남은 전자가 비편재화 (delocalization)된 상태로 존재하여 매우 안정한 자유 라디칼이다 [24]. 따라서 분자 내에 자유 라디칼이 존재하여도 이량화 (dimerize)되지 않는다. DPPH 분자 내에 자유 라디칼이 존재하면 보라색을 띠며 517 nm에서 최대 흡광값을 갖는다. 이러한 DPPH의 자유 라디칼이 항산화 물질을 만나 전자를 얻게 된다면 보라색이 노란색으로 변화한다.

나) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

2,2-Azino-bis(3-ethylbenzethiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼은 매우 안정한 자유 라디칼 (free radical)이다 [25]. 라디칼이 존재할 때는 푸른색을 나타내며 항산화 물질로 인하여 환원되면 투명한 색으로 변한다. ABTS 용액과 potassium persulfate 용액을 혼합하면 ABTS 라디칼이 생성되며, PBS (pH7.4)를 이용해 희석하여 항산화 활성을 측정한다.

다) Nitric oxide (NO·) scavenging activity

NO (nitric oxide)는 체내 세포의 nitric oxide synthase에 의해서 생성되며 arginine이 citrulline로 변할 때 생성된다 [26]. Sodium nitroprusside는 pH 7.4에서 자발적으로 NO 라디칼을 생성하며, 산화되어 NO^{2-}와 같은 질산이온을 형성한다. 생성된 질산이온은 Griess 반응으로 측정이 가능하다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3) 산소 라디칼

가) Hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging activity

일상생활에서는 음식의 섭취, 눈 또는 피부로 증기를 흡입으로 인하여 직·간접적으로 H_2O_2에 노출되어있다 [27]. H_2O_2가 체내로 들어오면 hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$)이 생성되며, 이는 lipid peroxidation을 촉진시키고 DNA에 손상을 입힌다.

나) Peroxynitrite radical (ONOO·) scavenging activity

Peroxynitrite는 강한 산화력을 라디칼로서 가진 라디칼반응으로서 생성되면 세포의 사멸 및 암 유발의 원인 물질이다 [28]. 다른 종류의 radical보다는 상대적으로 안정하지만 protonate되어 peroxynitrous acid (ONOOH)가 생성되면 강한 세포독성물질로 변한다. ONOOH는 단백질의 –SH group 및 지질의 산화 반응을 유발하며 세포의 metabolism에 영향을 미친다. 또한 흉선세포, 대뇌 세포 등에서 DNA 사슬을 파괴하고 세포를 사멸시킨다. 따라서 ONOOH가 체내에 다량 존재할 경우 동맥 경화증, 알츠하이머 등의 질병에 걸리기 쉽다. ONOO는 내성 효소 (endogenous enzyme)에 의하여 불활성된다.

다) Superoxide radical scavenging activity

Superoxide raidcal은 비교적 약한 라디칼이지만 hydroxyl radical을 생성할 수 있어 위험하다 [29]. Superoxide raidcal은 nitroblue tetrazolium (NBT)용액에 NADH를 혼합한 용액에 phenazine methosulfate (PMS)를 첨가하면 생성되기 시작한다.

4) 금속 chelating

가) Ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay는 Fe^{3+} 이온이 환원되는 정도를 측정하는 방법이다 [30]. 낮은 pH에서 실험을 하며 593 nm에서 흡광값 변화로 항산화 활성을 측정한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나) Potassium ferricyanide reduction (PFRAP)

PFRAP assay는 potassium ferricyanide가 항산화물질과 반응하여 potassium ferrocyanide로 환원되는 정도를 측정하는 방법이다 [31]. Potassium ferrocyanide가 생성되면 시료의 색이 파란색으로 변하고, 700 nm에서 흡광값을 측정하여 항산화 활성을 측정한다.

다) Cupric reducing antioxidant power (CUPRAC) assay

실험하고자 하는 항산화물질이 Cu^{2+} 이온을 Cu^{+} 이온으로 환원시키는 정도를 확인하는 실험이다 [32]. Standard 물질로는 trolox를 사용하고, 시료 1 mL에 함유되어 있는 trolox의 mg으로 나타낸다. 항산화를 측정할 sample을 CuSO4, neocuproine과 함께 혼합하여 30분 후에 450 nm에서 흡광값을 측정한다.

라) Hydroxyl radical scavenging activity

Hydroxyl radical은 reactive oxygen species (ROS) 중 하나이며 세포막의 인지질 층에 손상을 입힌다 [33]. Fenton reaction을 이용하여 hydroxyl radical을 만들어 deoxyribose와 반응시켜 radical scavenging을 확인한다.

마) Hydroxyl radical antioxidant capacity (HORAC) method

CO complex를 제조하여 항산화 능력을 측정하고, hydroxyl radical로 인한 세포 손상 보호능력을 측정한다 [23]. 형광색소를 이용하여 항산화활성을 측정하며, standard 물질로 gallic acid를 많이 사용한다. HORAC assay는 hydroxyl radical로부터 깨지기 쉬운 hydrophilic chain을 가지고 있는 물질의 항산화활성을 측정할 때 사용한다.

바) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method

ORAC assay는 산화 물질\에서 유도된 peroxyl radical에 대한 항산화 물질의 저해능을 측정하는 방법으로 수소 원자의 전이에 의해 나타나는 항산화 활성을 반영한다 [34]. ORAC assay에서 peroxyl radical은 형광 probe와 반응하여 비형광의 생성물

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

을 형성하는데, 항산화 활성은 시간에 따른 비형광 생성물의 양과 감소율을 평가하여 항산화 활성을 측정한다. 형광 probe와 peroxyl radical의 반응은 fluorescence reader를 사용하여 37℃, pH 7.4의 조건에서 2 min마다 30 min～1 hr동안 측정하며, 파장은 485 nm (excitation)와 535 nm (emission)를 사용한다. ORAC 반응은 온도에 민감하므로 온도 조절이 필수적이며, ORAC assay를 이용하여 동물의 조직이나 plasma, 채소, 과일 등 다양한 시료의 총 항산화 상태를 평가할 수 있으나, plasma나 단백질 함량이 높은 시료일 경우 단백질의 thiol group에 의해 peroxyl radical 소거가 방해 받게 된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

마. 항비만 (antiobesity)

비만 인구는 급격히 증가하는 추세이며, 세계보건기구 (WHO)에 따르면 1980년과 2014년 사이에 전 세계적으로 비만 인구가 약 두 배 증가하였다 [35]. 2014년 기준으로 18세 남성의 38%, 여성의 40%가 비만인 것으로 확인되었다.

과도한 음식 섭취와 낮은 에너지 소비로 인한 체내의 에너지 축적이 비만의 주요한 원인이며, 유전적 요인 및 환경적 요인에 의하여 비만이 발생할 수도 있다. 적당한 음식 섭취 및 높은 에너지를 소비로 생활습관을 변화시키면 비만을 예방할 수 있지만, 만성 비만인 식욕억제 및 에너지 소비는 매우 어려운 일이다.

혈중 glucose와 fatty acid 함량이 높아 에너지 축적이 지속되면 insulin과 같은 호르몬 분비에 이상이 발생하게 되면서 체내의 항상성이 무너지게 된다. 이와같이 에너지 축적으로 인하여 호르몬 분비에 이상이 오면 지방세포인 adipocyte의 분화가 진행된다 [36]. 분화된 adipocyte에서는 leptin과 adiponectin과 같은 호르몬을 자체적으로 분비하며, 이러한 호르몬을 adipokine이라 부르고 식욕촉진 및 에너지 소비에 영향을 미친다 [37].

비만을 치료하기 위해서는 지방 흡수 감소, 에너지 축적 감소, 에너지 소모 증가, adipocyte의 분화 감소, 지방생성 감소와 지방분해 증가가 필요하다 [38, 39]. 비만 환자들은 adipocyte가 분화되어 adipokine이 정상인에 비해 과분비 되는 특징이 있다. 비만은 열량 섭취량에 비해 소모하는 열량이 상대적으로 적기 때문에 발생되는 대사성 질환으로서, 단순한 체중의 증가가 아닌 체내 지방조직이 증가되는 상태를 말한다. 주로 식습관과 운동량 부족으로 유발 되는 경우뿐만 아니라 다양한 환경 및 유전적인 요인이 결합되어 발생하는 복합적인 질병이다. 일반적으로 비만치료제는 2가지 종류가 있는데 첫 번째, 교감신경을 흥분하는 약물을 사용하여 식욕을 억제하는 방법이며, 대표적인 약물으로 벨빅 (Belviq)이 있다. 그러나 벨빅은 복용 시 부작용으로 혈압 상승, 불면증, 입마름 현상이 발생하여 장기간 복용은 지양해야한다. 두 번째, 비만을 치료할수 있는 방법은 체내에서 지방 흡수를 위해 지방을 분해하는 효소인 lipase를 저해하는 저해제를 복용하여 지방 흡수를 저해하는 방법이다. 대표적인 약물로 올리스타트 (Orlistat)가 있으며 부작용으로는 지방변이 있다. 따라서 최근에는 안전하고 부작용의 위험이 적은 천연물 소재에 대한 관심이 점차 높아지고 있는 추세이며, 특히 식물에 다량 함유되어 있는 폴리페놀에 대한 연구가

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

활발하게 진행중이다. 폴리페놀은 지질 흡수 섭취 및 에너지 소모, 지방 분해 증가, 지방 생성 감소 등에 관여하여 항비만 효과가 있다 [40-42].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 연구동향 및 구성

가. 연구동향

A. 항산화 활성

모링가 잎에는 여러 종류의 phytocehmical이 함유되어 있어 높은 항산화 활성을 갖는 것으로 알려져있다 [43]. 재배환경 및 추출용매에 따라서 추출물의 성분 및 함량의 차이가 발생한다 [44]. Phytochemical의 종류에 따라서 항산화 활성을 갖는 작용기전이 상이하기 때문에 다양한 측정방법으로 항산화 활성을 접근하는 방법이 바람직하다고 판단된다 (Table 1).

Siddhuraju 등 (2003)은 Nicaragua, India, Niger에서 재배한 *M. oleifera*를 water, 70% ethanol (EtOH), 80% methanol (MeOH)로 추출하여 DPPH radical 소거능을 측정하였다 [45]. 실험결과 water 추출보다 70% EtOH, 80% MeOH의 추출물의 DPPH radical 소거능이 높았으며, 70% EtOH와 80% MeOH의 DPPH radical 소거능의 차이는 거의 없었다. 따라서 천연물에서 phytocehimcal을 추출할 때 water보다는 비극성을 가지고 있는 70% EtOH, 80% MeOH을 사용하는 것이 더 효과적인 방법으로 판단된다. Sreelatha 등 (2009)은 India에서 재배한 *M. oleifera*의 항산화 활성을 측정하기 위하여 모링가 잎 추출물의 항산화 효소인 CAT, GST, GPX, SOD 활성 측정과 DNA damage 보호효과 확인 및 DPPH radical, superoxide radical, nitric oxide radical 소거능을 측정하였다 [46]. 실험결과 모링가 잎 추출물은 항산화 효소 및 산화 스트레스에 대한 활성이 존재하였으며, radical 소거능 또한 존재하였다. 이는 모링가 잎 추출물은 다양한 작용기전으로 항산화 활성을 갖는 것을 증명한 논문이다. Fakurazi 등 (2012)은 Malaysia에서 재배한 *M. oleifera*의 항산화 활성을 DPPH radical 소거능과 metal chelation인 FRAP 방법을 이용하여 측정하였고, 산화 스트레스로 쥐의 간 손상을 유발하여 모링가 잎 추출물의 투여 후 산화 스트레스 지표인 melandialdehyde (MDA), CAT, GSH, SOD 함량을 측정하였다 [47]. 실험결과 DPPH radical 소거능과 FRAP 활성을 확인하였다. 또한, 간 손상이 유발된 쥐에게 모링가 잎 추출물을 투여하면 negative control보다 MDA, CAT, GSH, SOD 함량이 유의적으로 증가한 것을 확인하였고, positive control인 N-acetylcysteine (NAC)와 유의적으로 동일한 수치를 갖는 것을 확인하였다. 모링가 잎의 항산화 활성에 대한 연구가 활발하게 진행되었고, *in vivo* 실험인 쥐 실험까지 수행된 것을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Antioxidant activities of *M. oleifera* leaves extracts depending on extraction method, assay and cultivated county

Extraction method	Antioxidant assay		IC_{50}	Country	Refernece
Water	DPPH radical		2.00±0.05 g/g dw	Nicaragua	45
			3.07±0.22 g/g dw	India	
			2.72±0.13 g/g dw	Niger	
	Enzymatic assay	CAT activity	14.64±0.01 μg/mL	India	46
		GST activity	106.84±0.07 μg/mL		
		GPX activity	163.68±2.36 μg/mL		
		SOD activity	0.30±0.008 μg/mL		
	Non enzymatic assay	DNA damage	12.71±0.15 μg/mL		
		DPPH radical	18.15±0.92 μg/mL		
		Superoxide radical	25.32±0.54 μg/mL		
		Nitric oxide radical	72.45±0.23 μg/mL		
		Lipid peroxidation	56.77±0.45 μg/mL		
70% EtOH	DPPH radical		1.05±0.10 g/g dw	Nicaragua	45
			1.94±0.13 g/g dw	India	
			1.45±0.10 g/g dw	Niger	
80% EtOH	DPPH radical		158.8±5.3 μM TEAC/ 100 g dw	Malaysia	47
	FRAP		237.6±3.7 μM TEAC/ 100 g dw		
80% MeOH	DPPH radical		1.13±0.05 g/g dw	Nicaragua	45
			1.79±0.11 g/g dw	India	
			1.28±0.05 g/g dw	Niger	
MeOH	DPPH radical		387 μg/mL	Taiwan	48
	Hydrogen peroxide		340 μg/mL		
	SOD activity		2.00 μg/mL		

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. 항비만 활성

모링가 잎 추출물을 투여하여 쥐의 체중감량 및 adipose tissue의 adipokine 발현량을 PCR을 이용하여 실험한 연구가 다소 존재하지만 현재 모링가 잎 추출물의 항비만 활성에 대한 정확한 기전은 밝혀지지 않았다. Bais 등 (2014)은 India에서 재배된 *M. oleifera* 잎 추출물의 항비만 활성을 측정하기 위하여 7주 동안 high-fat 사료를 공급한 HFD 그룹, high-fat 사료에 200mg/kg의 모링가 잎 추출물을 혼합하여 제조한 사료를 공급한 HFD + MEMOL 그룹으로 나누어 체중, 체온, 혈청 내 cholesterol 및 triglycerides 수치, 장기 무게를 측정하였다 [49]. 실험결과 체중은 HFD 그룹에 비하여 HFD + MEMOL 그룹이 유의적으로 감소하였으며, 체온은 HFD 그룹에 비하여 HFD + MEMOL 그룹이 유의적으로 높았다. 체온이 높아지면 에너지 소비가 증가하여 항비만 효과가 발생한다. 혈청 내 cholesterol 및 triglycerides 수치 측정결과 HFD 그룹에 비하여 HFD + MEMOL 그룹이 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다. 간과 신장의 무게 측정 결과 HFD 그룹에 비하여 HFD + MEMOL 그룹이 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었으며, 혈중 내 fat의 함량이 증가하면 장기 내의 adipose tissue에서 triglyceride 함량이 증가하여 무게가 증가하게 된다. Metwally 등 (2017)은 Egypt에서 재배된 *M. oleifera* 잎 추출물의 항비만 활성을 측정하기 위하여 쥐에게 12주동안 high-cholesterol 사료를 공급한 Ob 그룹, high-cholesterol 사료와 모링가 잎 추출물을 혼합하여 제조한 사료를 공급한 Ob + *M. oleifera* 그룹으로 나누어 체중, 인슐린 저항성과 adipose tissue에서 분비하는 adipokine인 leptin, resistin의 발현량을 RT-PCR을 이용하여 측정하였다 [50]. 실험결과 Ob 그룹은 일반사료를 섭취한 control 그룹에 비하여 체중이 많이 증가하였으며, Ob + *M. oleifera* 그룹은 Ob 그룹에 비하여 체중이 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다. Ob 그룹에서는 인슐린 저항성이 나타났으며, Ob + *M. oleifera* 그룹에서는 인슐린 저항성이 나타나지 않았다. RT-PCR 실험결과 Ob + *M. oleifera* 그룹의 leptin, resistin의 발현량은 Ob 그룹에 비하여 유의적으로 감소하였다. 이와 같이 쥐 실험을 통하여 모링가 잎 추출물 섭취 시 항비만 활성을 측정한 연구가 존재하였지만, 소화 효소 억제 및 지방세포 내에서의 전사인자 발현량을 실험한 연구는 미흡하며, 항비만에 관한 매커니즘 규명이 필요한 시점이다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 연구의 구성

모링가는 아열대 작물로서 인도, 아프리카, 필리핀, 태국, 캄보디아 등에서 주로 재배된다. 하지만 최근 기후변화로 인하여 국내에서도 재배되고 있다. 모든 식물들과 유사하게 모링가 또한 성장하는 환경에 따라서 phytochemical 등 구성성분이 변화하여 본 연구에서는 국내산 모링가 잎과 국외산 모링가 잎의 phytochemical 분석 등 항산화, 항비만 효능을 비교하였다. 최근 건강에 대한 관심이 증가하면서 식물에 존재하는 생리활성물질인 phytochemical에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 모링가 (*Moringa oleifera*)는 단백질과 비타민이 풍부해 영양가가 높고, 의약적으로 과혈당증, 항염증, 항암 등 다양한 약리작용을 가지고 있어 기적의 나무라고 불리며, 오랜 기간 동안 전통적인 약제로 사용되었다. 본 연구에서는 모링가 잎 추출물에 함유되어 있는 phytochemical을 분석하고, 항산화 및 항비만 활성을 radical 소거능, 효소 저해 활성 및 세포 실험으로 확인하고자 하였다 (Fig. 4). 본 실험에 사용된 모링가잎은 국내에서 유통되고 있는 국내산 (경남 영천), 국외산 (캄보디아) 건조 모링가 잎을 열수 및 주정추출 후 농축하여 실험을 진행하였다. 추출물의 phytochemical 분석은 polyphenol과 isothiocyanate로 나누어서 진행하였으며, HPLC를 이용하여 분석하였다. 항산화 효능을 측정하기 위하여 ABTS, DPPH radical scavenging과 SOD-like activity를 실험하였다. 항비만 효능을 측정하기 위하여 α-glucosidase와 lipase에 대한 효소 활성 저해 실험을 진행하였으며, 지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 lipogenesis에 관련된 C/EBPα, PPARɣ, FAS, ACC의 단백질 발현을 western blot으로 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

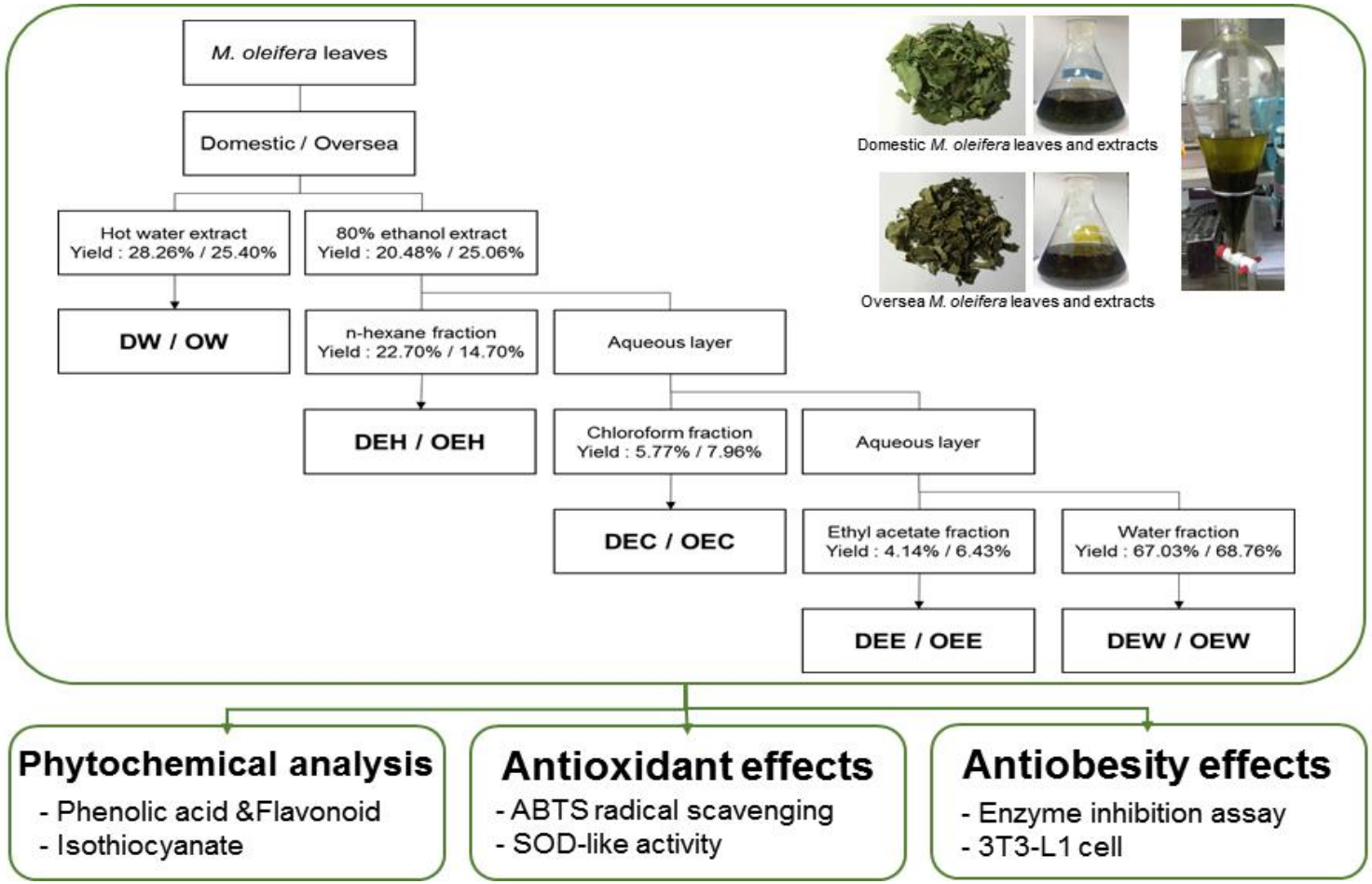


Figure 4. Schematic of experiments depending on extraction method, phytochemical analysis, antioxidant and antiobesity effect.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2장 모링가 잎 추출물의 phytochemical 분석

1. 재료 및 방법

가. 모링가 잎 추출

국내에서 유통되고 있는 국내산 (경남 영천), 국외산 (캄보디아) 건조 모링가 잎을 5kg씩 공급받아 사용하였다.

A. 열수추출 (aqueous extract)

추출물의 수율을 증가시키기 위하여 가압추출법을 사용하여 추출하였다. 50 g 모링가 잎을 1.2 L 증류수에 침지 후 autoclave를 사용하여 121℃에서 90 min동안 가압 추출하였다. 추출물의 효능 (항산화 활성 및 플라보노이드 함량 등)을 실험하기 위하여 Whatman No. 4를 이용해 여과한 후, 감압농축기를 이용하여 농축 후 사용하였다.

B. 주정추출 및 층분리 (ethanolic extract and fractionation)

50 g 모링가 잎을 1.2 L 80% EtOH에 침지 후 상온 (25±2℃)에서 24 hr동안 추출하였다. 추출물의 효능 (항산화 활성 및 플라보노이드 함량 등)을 실험하기 위하여 Whatman No. 4를 이용해 여과한 후, 감압농축기를 이용하여 농축 후 사용하였고, hexane, chloroform, ethyl acetate를 이용해 층분리하여 농축 후 사용하였다. 열수 및 주정추출물의 약자는 Table 2와 같이 표시하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Abbreviations of *M. oleifera* extracts sample

Sample	Abbreviation
Domestic *M. oleifera* leaves aqueous extracts	DW
Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - hexane fraction	DEH
Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - chlorofrom fraction	DEC
Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - EtOAc fraction	DEE
Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - water fraction	DEW
Oversea *M. oleifera* leaves aqueous extracts	OW
Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - hexane fraction	OEH
Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - chlorofrom fraction	OEC
Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - EtOAc fraction	OEE
Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts - water fraction	OEW

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 폴리페놀 함유량 분석

A. Total polyphenol contents

Total phenolic content (TPC)는 수정된 Folin-Denis법을 사용하여 측정하였다 [51]. 농축한 추출물을 MeOH을 사용하여 1,000 μg/mL 농도로 희석하여 실험하였다. 추출물 1,000 μg/mL, 0.2 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent와 2% Na_2CO_3을 1:1:1의 부피로 혼합하여 실온에서 30 min동안 반응시켰다. UV-VIS spectrophotometer을 사용하여 750 nm 파장에서 흡광도을 측정하였고, TPC는 표준물질인 gallic acid 기준 농도 GAE mg/g로 나타내었다.

B. High performance liquid chromatography (HPLC)

모링가 잎 추출물에 함유되어있는 플라보노이드를 정량분석하기 위하여 HPLC (SPD-20A, SHIMADZU CO., Japan)를 사용하였다. Standard 물질로 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, ρ-coumaric acid, quercetin을 이용하였다. Column은 Shim-pack GIS-ODS (C18, 4.6x250 mm, 5.0 μm, SIMADZU Co., Japan)을 사용하였다. Mobile phase로는 1% acetic acid (solution A)와 acetonitrile (solution B)을 사용하였고, gradient program을 이용하여 solution B를 0-15 min 18-32%, 15-40 min 32-50%, 40-45 min 50-100%, 45-50 min 100%, 50-60 min 100-18%, 60-70 min 18%로 설정하였다. Flow rate 0.8 mL/min, column temperature 40℃, injection volume 20 μL, UV detector의 wavelength는 280 nm로 설정하여 분석하였다.

다. 아이소싸이오사이아네이트 함유량 분석

모링가 잎 추출물에 함유되어있는 아이소싸이오사이아네이트를 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. Standard 물질로 sulforaphane을 이용하였다. Column은 Shim-pack GIS-ODS을 사용하였다. Mobile phase로는 water (solution A)와 acetonitrile (solution B)을 사용하였고, gradient program을 사용하여 solution B를 0-10 min 30-75%, 10-20 min 75%, 20-22 min 75-30%, 22-25 min 30%로 설정하였다. Flow rate 0.7 mL/min, column temperature 30℃, injection volume 20 μL, UV detector의 wavelength는 195 nm로 분석하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 실험결과 및 토의

가. 모링가 잎 추출 수율

천연물의 추출용매로는 열수추출 및 주정추출이 많이 이용된다. 열수추출은 추출물의 안정성이 보장되어 식품 및 화장품원료로 적용 가능하여 많이 연구되고, 주정추출은 phytochemical과 같은 유용성분이 많이 추출되어 실험의 목적으로 많이 이용되지만 안정성의 검증이 필요하다. 또한, 천연물 추출 시 70~80% EtOH은 원물이 건조된 상태일 때 사용하는데, 이는 세포벽 내로 물 분자가 흡수되어 EtOH의 접근성을 높이기 위한 조건이다 [52].

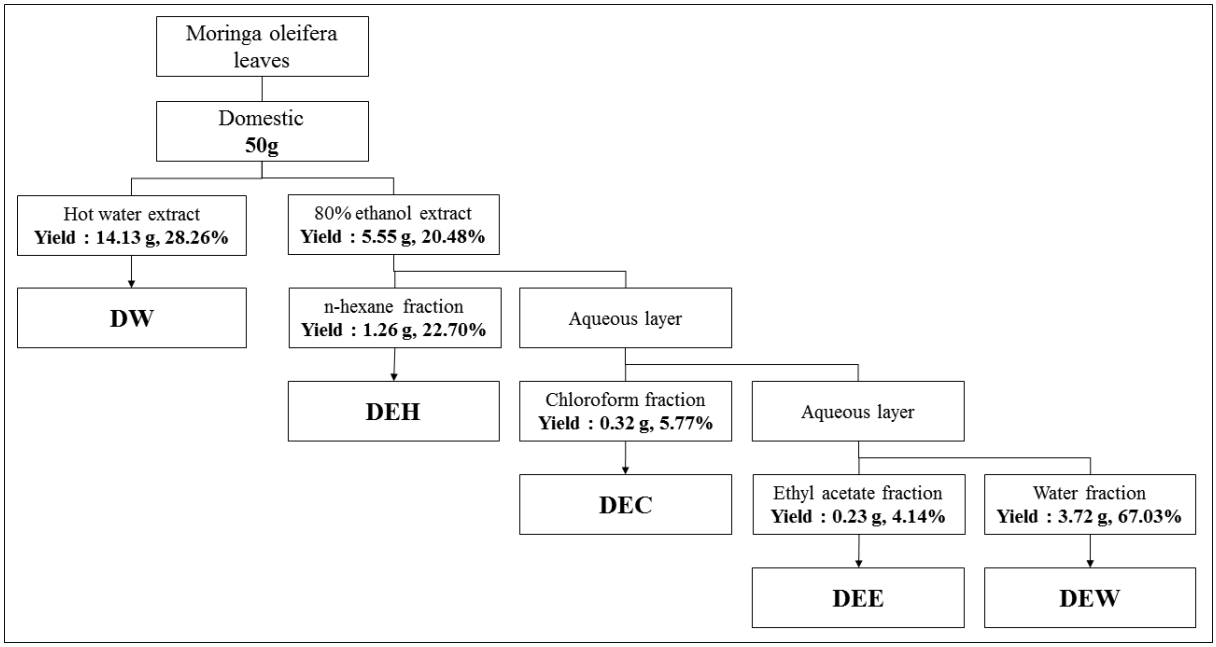
추출물의 수율은 다음과 같은 식으로 구하였으며, Fig. 5에 각 각의 추출물의 수율을 정리하였다.

$$Yield\,(\%) = \frac{Weight\,of\,concentrated\,sample\,after\,extraction\,(g)}{Weight\,of\,dried\,moringa\,leaves\,(g)} \times 100$$

추출방법 중 수율이 가장 높은 시료는 국내산 모링가 잎을 열수추출 (DW)한 방법이였다. 국외산 모링가 잎 열수추출물 (OW) 보다 수율이 약 3% 높았는데, 이는 국내산 모링가 잎에 극성을 가진 phytochemical 함유량이 높은 것으로 판단된다. 그러나 주정추출인 경우 국외산 주정추출물의 수율이 약 5% 높았는데, 이는 국외산 모링가 잎에 분자 내 극성과 비극성을 함께 갖거나 비극성인 phytochemical 함유량이 높은 것으로 판단된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



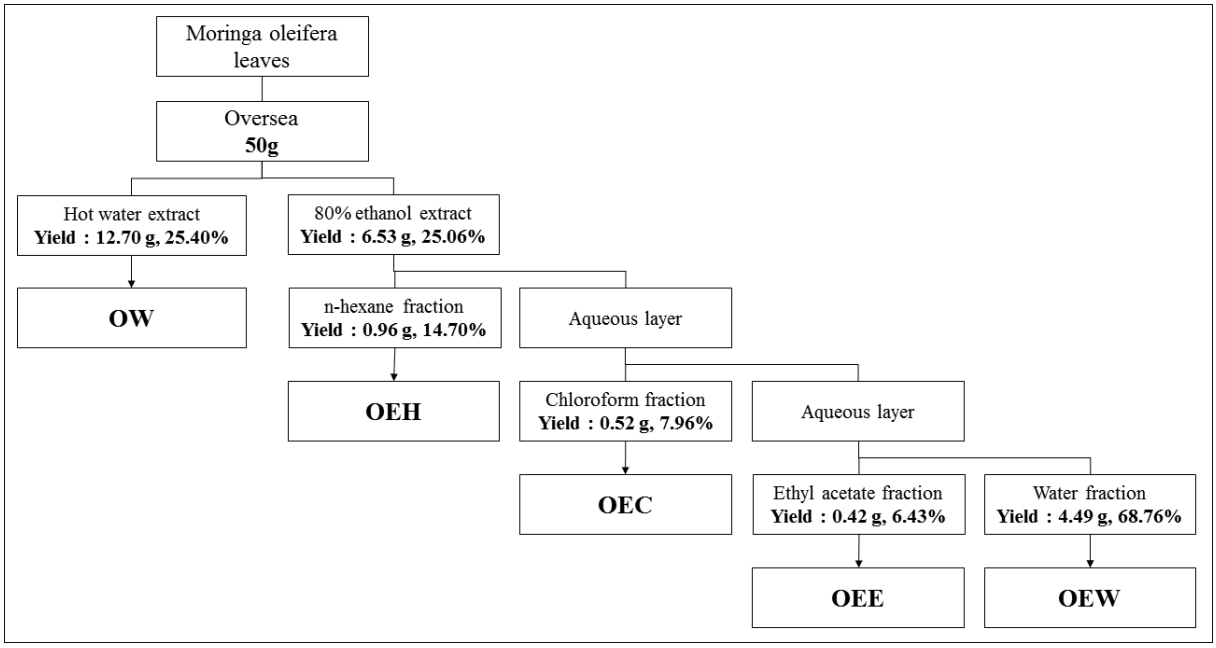


Figure 5. Yields of *M. oleifera* extracts.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 폴리페놀 함유량 분석

A. Total polyphenol contents

천연물 추출물에는 탄수화물, 단백질, 폴리페놀 등 여러 가지 물질이 함유되어있다. 추출물에 함유된 폴리페놀 함량을 측정하는데 많이 사용되는 방법으로서 gallic acid를 standard 물질로 사용하여 추출물 내의 gallic acid의 함량을 비색법으로 측정하는 방법이 있다. 이는 반응이 비교적 간단하고 실험에 소요되는 시간이 짧아 많이 사용되는 방법이지만, gallic acid와 비슷한 분자 구조의 물질도 함께 측정되어 정확한 방법은 아니다. 따라서 추출물의 정확한 폴리페놀 함유량을 측정하려면 HPLC, HPLC-MS와 같은 정량분석이 필요하다.

실험결과는 Fig. 6과 같으며, 국내산 모링가 잎 추출물의 TPC 분석결과를 보면 DEW의 값이 가장 높게 측정되었다. 이는 국내산 모링가 잎에는 수용성 polyphenol이 많이 함유되어 있는 것으로 판단된다. 모든 sample 중 OEE의 TPC 함량이 가장 높았다. TPC 측정은 gallic acid를 standard 물질로 정하여 측정하는 방법으로서, 다른 종류의 polyphenol 함량을 측정하는데는 어려움이 있다. 따라서 정확한 함량을 측정하기 위하여 HPLC를 이용하여 분석을 진행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

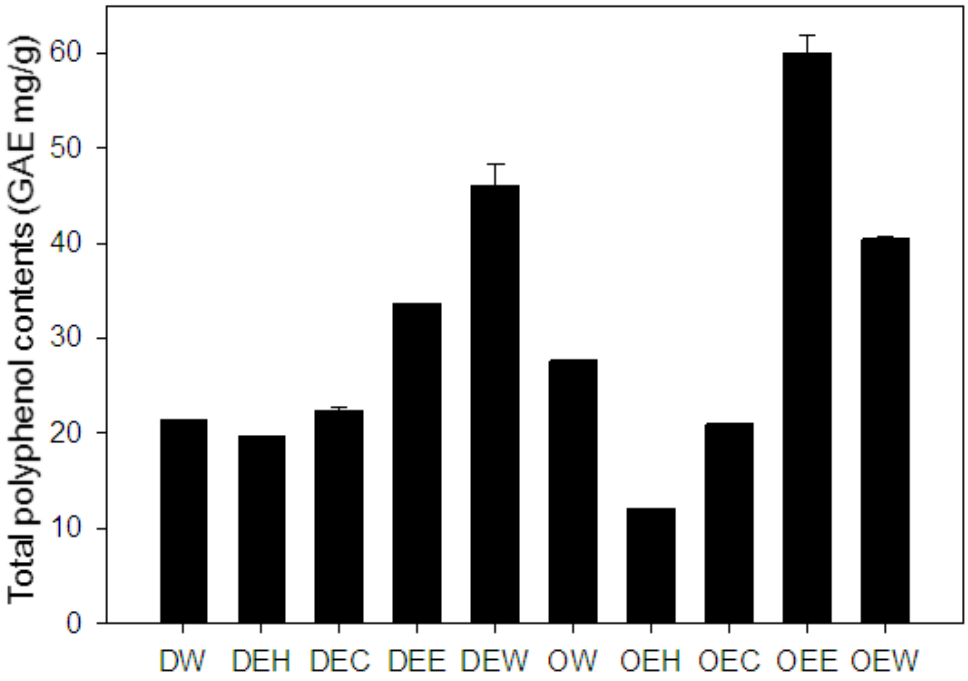


Figure 6. Total polyphenol contents in *M. oleifera* extracts.

(DW_Domestic *M. oleifera* leaves aqueous extracts, DEH_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-hexane fraction, DEC_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-chloroform fraction, DEE_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction, DEW_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-water fraction, OW_Oversea *M. oleifera* leaves aqueous extracts, OEH_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-hexane fraction, OEC_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-chloroform fraction, OEE_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction, OEW_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-water fraction)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. High performance liquid chromatography (HPLC)

추출물 내에 존재하는 폴리페놀의 성분 및 정량분석 시에는 HPLC, HPLC-MS가 많이 이용된다. 폴리페놀의 구조에 따라서 극성이 다르기 때문에 HPLC를 이용하여 용매를 극성에서 비극성 조건으로 변화하면서 분석을 진행한다. 또한 detector가 존재하여 UV 파장대에 대한 피크의 크기로 standard 물질에 비하여 추출물에 함유된 함량을 정량분석할 수 있다.

분석결과는 Table 3와 같으며, 열수추출물 (DW, OW)에 많이 함유되어 있는 성분은 gallic acid였으며, 주정추출물의 EtOAc fraction (DEE, OEE)에 많이 함유되어 있는 성분은 ρ-coumaric acid였다. Standard 물질로 선정한 polyphenol의 함량을 합하여 total으로 나타내었으며, OEE, DW, DEE, OW 순서로 total 값이 높았다. Vongsak 등 (2013)은 *M. oleifera* 잎을 태국에서 수확 후 건조하여 열수추출 (100℃, 30 min)과 주정추출 (50% EtOH, 70% EtOH, 28±2℃, 72 hr)하여 추출물의 isoquercetin 함유량을 HPLC로 분석하였다 [44]. 열수추출물에는 isoquercetin이 존재하지 않았고, 주정추출물에는 isoquercetin이 존재하였으며, EtOH의 농도가 높을수록 함유량이 증가하였다. 이는 본 실험과 유사한 실험결과이다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Phytochemical anyalysis data of *M. oleifera* extracts using HPLC

unit : mg/extract g

Sample	Gallic acid	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Rutin	ρ-Coumaric acid	Quercetin	Total
DW	38.37	N. D.	29.61	18.63	36.90	N. D.	123.51
DEH	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	0
DEC	N. D.	N. D.	0.48	6.89	0.88	N. D.	8.25
DEE	8.76	N. D.	14.76	56.10	26.33	10.93	116.88
DEW	33.86	N. D.	15.65	20.21	11.83	N. D.	81.55
OW	45.73	18.53	22.43	19.83	7.60	N. D.	114.12
OEH	N. D.	N. D.	N. D.	10.15	5.50	2.66	18.31
OEC	13.17	N. D.	N. D.	24.15	N. D.	14.26	51.58
OEE	8.50	N. D.	20.12	85.54	29.90	15.92	159.98
OEW	38.90	N. D.	27.00	N. D.	14.58	N. D.	80.48

N. D._ Not Detected, DW_Domestic *M. oleifera* leaves aqueous extracts, DEH_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-hexane fraction, DEC_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts- hloroform fraction, DEE_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction, DEW_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-water fraction, OW_Oversea *M. oleifera* leaves aqueous extracts, OEH_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-hexane fraction, OEC_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-chloroform fraction, OEE_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction, OEW_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-water fraction

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 아이소싸이오사이아네이트 함유량 분석

아이소싸이오사이아네이트는 glucosinolate가 외부의 자극을 받아 myrosinase에 의해 분해되어 생성되는 물질로서 원물에 존재하는 glucosinolate 함량에 영향을 받는다. 또한 모링가 잎 채취 및 분쇄 과정에서 자극의 정도에 영향을 받는 요인이다. 이는 모링가 자체적으로 자신을 보호하기 위해서 생성하는 물질로서 쓴맛을 가지고 있다.

모링가 잎 추출물을 HPLC로 아이소싸이오사이아네이트의 종류인 sulforaphane을 분석한 결과, sulforaphane은 DEE에서 9.66 mg/extracts g과 OEE에서 1.53 mg/extracts g 검출되었다. 아이소싸이오사이아네이트의 함유량은 모링가의 성장환경에 영향을 많이 받은 phytochemical로서 국내산 및 국외산 모링가 잎의 성장환경이 영향을 미친 것으로 판단된다. 또한, glucosinolate 및 myrosinase의 함량을 측정하면 더 정확한 아이소싸이오사이아네이트의 함량을 분석 가능할 것으로 판단된다.

Chodur 등 (2018)은 원산지가 다른 36종의 *M. oleifera*의 씨앗을 수집하여 멕시코의 Jalisco 지역에서 재배해 잎에 함유되어 있는 glucosinolate 종류인 glucomoringin과 glucosoonjnain 함유량을 분석하였다 [14]. 실험결과 동일한 재배환경에서 원산지가 다른 모링가 잎의 glucosinolate의 함유량과 구성 성분은 상이하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3장 모링가 잎 추출물의 항산화 효능

1. 재료 및 방법

가. ABTS radical scavenging

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline6-sulfonic acid (ABTS)를 사용하였고 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1의 비율로 혼합한 후, 730 nm에서의 흡광도가 0.80±0.02가 되도록 PBS (pH 7.4)로 희석하여 ABTS stock solution을 제조하였다. 농축한 추출물을 20 μg/mL ~ 1,000 μg/mL의 농도로 희석하여 실험하였다. ABTS stock solution과 희석한 추출물을 5:1의 비율로 혼합하여 암실에서 25±2℃으로 15 min동안 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer를 이용하여 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control으로 gallic acid를 사용하였다. ABTS 라디칼을 50% 소거하는데 상응하는 농도로 각 각의 추출물의 IC_{50} 값을 계산하였다.

나. DPPH radical scavenging

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA)를 95% EtOH에 DPPH를 용해하여 0.1 mM DPPH stock solution을 제조하였다. 농축한 추출물은 MeOH을 이용하여 500 μg/mL ~ 10,000 μg/mL으로 희석하여 사용하였다. 농도별로 제조한 추출물 200 μL와 800 μL DPPH stock solution을 혼합하여 15 min동안 암실에서 반응 후 UV-VIS spectrophotometer사용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Positive control으로 gallic acid를 사용하였다. 추출물의 IC_{50}는 DPPH radical에 대한 소거능을 나타내며 radical을 50% 제거하는데 상응하는 농도로 나타내었다.

다. SOD (superoxide dismutase)-like activity

SOD 활성 측정은 sigma 사의 SOD determination kit (19160)를 이용하였다. Xanthine oxidase (XO)로 인하여 superoxide anion ($O2^{\cdot-}$)이 생성되면 WST-1 (2-(4-Iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2Htetrazolium, monosodium salt)과 반응하여 WST-1 formazan이 형성된다. WST-1 formazan은 450 nm에서 최대 흡광도를 가지며, XO와 반응하지 않아 정확한 SOD 활성을 측정할 수 있다. 측정

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

하고자 하는 샘플에 SOD가 존재하면 superoxide anion과 SOD가 만나 inhibition reaction이 발생하여 WST-1이 WST-1 formazan으로 형성되지 않아, 비색법을 이용하여 SOD 활성 정도를 측정할 수 있다.

SOD determination kit에는 총 4가지 용액 (WST solution, enzyme solution, buffer solution, dilution buffer)이 들어있으며, 이 용액들을 이용하여 2가지의 working solution을 제조한다. 첫 번째로 WST working solution은 1 mL WST solution을 19 mL buffer solution에 희석하여 제조한다. 두 번째로 enzyme working solution은 15 μL enzyme solution을 2.5 mL dilution buffer에 희석하여 제조한다. 실험하고자하는 sample 20 μL, 200 μL WST working solution, 20 μL enzyme working solution을 혼합한 뒤 37℃에서 20 min동안 반응시키며, 활성은 아래의 식으로 계산하였다.

$$SOD\ activity\,(inhibition\,rate\,\%) = \frac{(Blank1 - Blank3) - (Sample - Blank2)}{(Blank1 - Blank3)} \times 100$$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 실험결과 및 토의

가. ABTS radical scavenging

ABTS radical scavenging은 항산화 활성을 radical scavenging으로 측정하는 방법으로서 극성을 띠고 있는 물질에서 소거활성이 높은 것으로 알려져 왔다 [53]. ABTS 용액과 산화제인 potassium persulfate를 혼합하면 ABTS가 산화되어 ABTS radical이 생성되며, 푸른색을 띤다. ABTS radical이 항산화제에 의하여 환원되면 푸른색에서 투명색으로 변화하게 된다. 따라서 비색법을 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다. DPPH radical도 비색법을 이용한 항산화능을 측정하는 방법인데, 가장 큰 차이는 ABTS radical은 양이온 radical이며 DPPH radical은 free radical인 것이다. 따라서 radical의 종류에 따라서 항산화제와 결합하여 radical을 소거하는 능력도 차이가 있다.

ABTS radical scavenging을 측정한 결과 DEE, OEE, DW, OW의 순서로 radical 소거능이 우수하였으며, IC_{50} 값은 각 각 69.07 μg/mL, 71.78 μg/mL, 726.55 μg/mL, 821.30 μg/mL이였다 (Fig. 7(A)). 이는 추출물에 함유되어 있는 polyphenol의 분자의 구조 및 성질에 따라서 ABTS radical과 반응하는 정도가 달라지기 때문이라고 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. DPPH radical scavenging

DPPH는 비교적 안정한 free radical로서 항산화 물질에 의해 환원되어 색이 변화하여 수소 공여능이나 유리기 소거능을 평가하며, 이는 천연물의 항산화 활성 측정에 많이 활용된다 [54]. Kang 등 (1995)은 DPPH radical scavenging이 phenolic acid와 플라보노이드 및 기타 페놀성 물질에 대한 항산화 활성의 지표라 하였으며, 이러한 물질의 환원력이 클수록 라디칼 소거능은 상승하게 된다고 하였다 [55]. DPPH radical은 체내에서 생성되는 메카니즘이 아니라 인위적으로 만들어져 체내에서의 생성된 다른 라디칼과 다른 메카니즘으로 항산화 활성을 나타낸다. 하지만, 간단하면서 안정한 radical을 활용하여 비교적 평가하기가 쉬워 식품이나 식물에 존재하는 항산화제의 평가방법으로 가장 많이 이용되고 있다.

DPPH radical scavenging을 측정한 결과 OEE, DEE, OW, DW의 순서로 radical 소거능이 우수하였으며, IC_{50} 값은 각 각 2834.86 μg/mL, 4168.90 μg/mL, 4343.70 μg/mL, 7478.79 μg/mL이였다 (Fig. 7(B)). DPPH radical은 극성과 비극성을 함께 띠고 있는 물질에서 소거활성이 높은 것으로 알려져 왔다 [54]. 따라서 주정추출 EtOAc fraction의 항산화능이 높으며, 열수추출물의 항산화능이 낮은 것으로 판단된다. 또한 HPLC의 폴리페놀 함유량을 보면 DW에는 극성인 물질이 많고, OW에는 극성과 비극성의 물질이 혼합되어 있어 DW보다 OW의 항산화 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. SOD-like activity

일상생활에서 급격한 환경 변화 또는 스트레스를 받을 때는 평소 활성산소의 약 10배에 달하는 활성산소가 생성된다. 활성산소는 화학적 산화력이 강하여 생성되면 세포를 산화시켜 손상이 발생하는데, 미토콘드리아의 matrix나 조직에는 산소 자유라디칼을 소거시켜주는 효소가 존재하여 우리 몸의 항상성을 유지시켜준다. 이러한 효소를 항산화 효소라고 하며 대표적으로 SOD, CAT, GPX, GRD 등이 있다. 온도 및 외부 환경 변화는 스트레스로 작용하여 활성산소 생성을 촉진하기 때문에, 항산화 효소 또한 온도 및 외부 환경 변화에 효소 활성이 증가한다.

SOD (superoxide dismutase)는 체내에서 발생하는 superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$)를 O_2와 H_2O_2로 분해하는 효소이며, 항산화 효소로서 세포를 oxidative stress로부터 보호하는 작용을 한다. SOD 활성 측정 시 많이 사용되는 방법은 Beter Jr 등 (1987)의 방법으로 nitroblue tetrazolium (NBT)로 측정하는 방법이다 [56]. 그러나 이는 낮은 수용성을 가지고 있으며 부수적인 반응이 많이 발생하여, 본 실험에서는 높은 수용성을 갖는 WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2Htetrazolium, monosodium salt)으로 발색을 하여 실험을 진행하였다. 또한 superoxide anion을 분해하는 활성을 측정하지 않고, superoxide anion 생성에 관여하는 xathine oxidase의 저해 활성을 측정하여 모링가 잎 추출물의 SOD-유사 활성을 측정하였다. Xanthine oxidase는 O_2 존재 하에서 xanthine을 산화시켜 요산과 superoxide anion을 생성한다.

SOD-like activity를 측정하여 IC_{50} 값으로 결과를 나타내었으며, DEE, OEE, OW, DW의 순서로 SOD radical 소거능이 우수한 것으로 측정되었으며, IC_{50} 값은 각 각 44.90 μg/mL, 51.24 μg/mL, 465.25 μg/mL, 595.21 μg/mL이였다 (Fig. 7(C)). ABTS와 DPPH radical scavenging의 결과와 유사하게 열수추출물 (DW, OW)과 주정추출물 EtOAc fraction (DEE, OEE)의 IC_{50} 값의 차이는 많이 존재하며, DEE와 OEE의 SOD radical 소거능이 우수하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

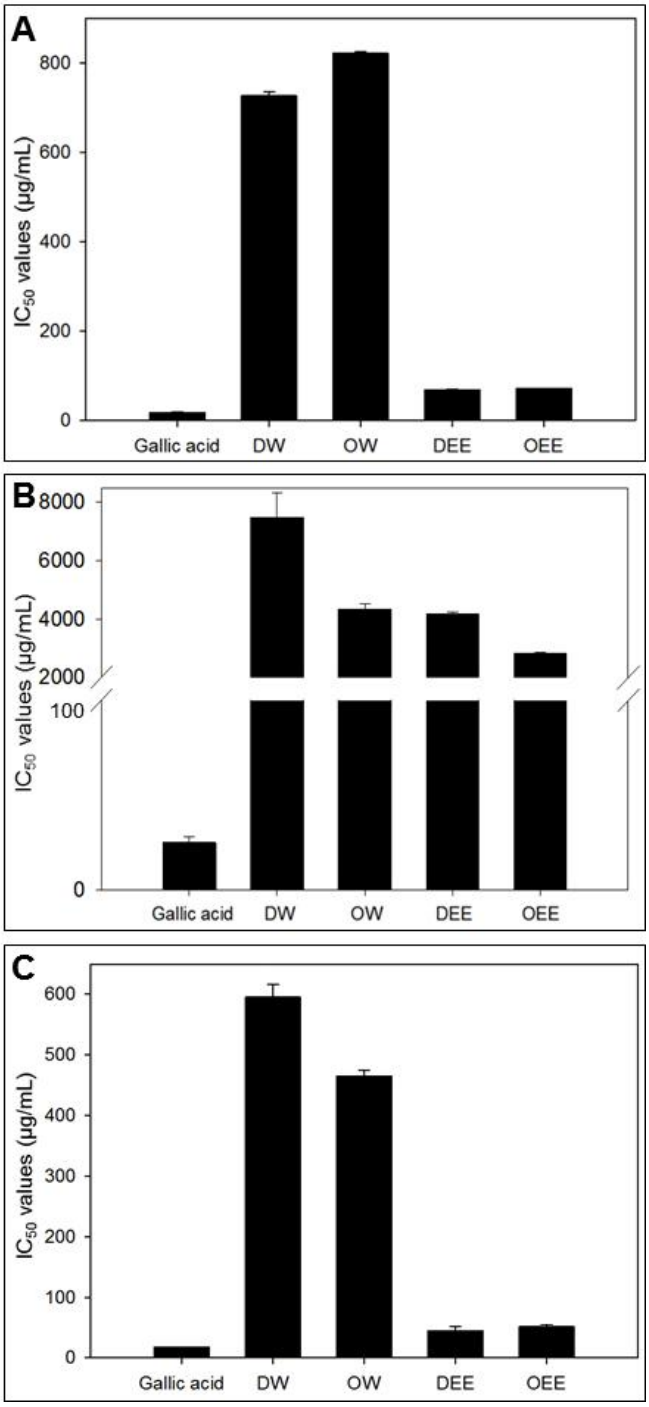


Figure 7. IC_{50} values of antioxidant assay results. (A) ABTS radical scavenging, (B) DPPH radical scavenging, (C) SOD-like activity.

(DW_Domestic *M. oleifera* leaves aqueous extracts, OW_Oversea *M. oleifera* leaves aqueous extracts, DEE_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction, OEE_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제4장 모링가 잎 추출물의 항비만 효능

1. 재료 및 방법

가. 효소 활성 저해

A. α-Glucosidase inhibition assay

5,000 μg/mL 모링가 잎 추출물 (DW, OW, DEE, OEE) 100 μL와 1 unit/mL α-glucosidase 25 μL를 혼합하여 37℃에서 10 min동안 방치하였다. 5mM ρ-nitrophenyl α-D-glucopyranoside 100 μL를 첨가하여 37℃에서 10 min동안 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control으로는 5,000 μg/mL acarbose를 사용하였다.

B. Lipase inhibition assay

Pancreatic lipase 0.3 mg에 10 mM MOPS/1 mM EDTA (pH 6.8) 50 μL를 혼합한 후 100 mM Tris-HCl/5 mM $CaCl_2$ (pH 6.8) 850 μL를 첨가하여 enzyme buffer를 제조하였다. Enzyme buffer에 모링가 잎 추출물 (DW, OW, DEE, OEE) 100 μL를 첨가하여 37℃에서 15 min동안 반응시켰다. 반응 후 10 mM p-NPB 20 μL를 첨가하여 37℃에서 15 min동안 반응 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 3T3-L1 cell

A. 세포 성장

지방 세포의 분화를 위해 100 Φ tissue cultrue dish에 2 day동안 세포 배양 후 세포가 바닥면적의 90% 이상 자라면 6-well tissue culture plate에 1×10^5 cell/well의 세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 배지로 교체하였다. 2 day 경과 후 MDI가 든 배지로 교체하면서 시료를 농도 별로 처리하여 2일 간격으로 총 2회 insulin과 시료를 처리하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. MTT assay

세포를 24 well plate에 배양한 후, 후보약물들을 농도별로 24 hr 또는 48 hr 동안 처리하였다. 생존해 있는 세포를 MTT (0.2 mg/ml)시약에 1 hr동안 반응 시킨 후, 상층액을 제거하고 well 당 200 µl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣어 생성된 formazan crystals을 녹여내었다. 마지막으로 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아무것도 처치하지 않은 vehicle 처리군과 비교하였다.

C. Oil red O staining

24 well plate에 있는 염색할 세포를 4% formalin에 1 hr동안 고정시킨 후, oil red O working solution에 1 hr동안 상온에서 염색시켰다. 그 후 PBS로 두 번 세척하고, light microscope로 이미지를 현상하였다. 이미지 현상 후, 각 well 당 300µl iso-propanol을 넣고, 20 min동안 상온에서 반응시켰다. .마지막으로 microplate reader를 이용하여 500 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

D. Western blot

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 lysis buffer를 첨가해 cell을 lysis 시킨 후 14,000 rpm에서 20 min동안 원심분리 하였다. Protein의 정량은 Bradford법을 이용해 측정하였다. 25 g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE)로 변성 분리하고, 이를 polyvinyildene difluoride (PVDF) membrane에 transfer하였다. Membrane을 blocking 시킨 후, 2.5% nonfat dry milk가 함유된 Tris-buffered saline with 0.2% Tween-20 (TBST)에 1차 항체를 넣고 상온에서 1hr 동안 반응 시켰다. 1차 항체와 반응시킨 membrane을 TBST로 3회 세척하고 2차 항체와 상온에서 1 hr동안 반응시킨 뒤에 TBST로 3회 세척하여 ECL advance detection system으로 각 band의 양상을 확인하였다. Western blot으로 단백질 발현 측정하기 위해 β-actin (Cell signaling), C/EBPα (Santa Cruz), PPARɣ (Santa Cruz), FAS (SantaCruz), ACC (Santa Cruz), Anti-Rabbit-HRP (Cell signaling), Anti-Mouse-HRP (Santa Cruz)을 구입하여 실험에 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 실험결과 및 토의

가. 효소 활성 저해

A. α-Glucosidase inhibition assay

인간은 탄수화물로서 녹말, 식이섬유 등과 같은 polysaccharide를 섭취하는데, 이는 침과 이자액의 amylase에 의하여 oligosaccharide와 disaccharide로 분해된다. α-Glucosidase는 소장 상피세포에 존재하는 효소로서, oligosaccharide와 disaccharide를 monosaccharide인 glucose로 분해하는데 관여한다. Disaccharide와 monosaccharide는 체내에서 혈당을 급상승시켜 인슐린의 과잉 분비로 인하여, 스트레스 호르몬이 분비되어 내장지방 축적의 원인이 된다. α-Glucosidase의 활성을 저해하게 되면 탄수화물의 최종 소화 산물인 glucose 생성을 억제되어, 탄수화물의 체내 섭취가 제한된다. Acarbose는 α-glucosidase 저해제로 알려져 있으며, 최근 천연물에서 α-glucosidase 저해활성을 측정하는 실험이 진행되고 있다 [57].

실험결과 DW, OW, DEE, OEE 모두 α-glucosidase의 저해 활성을 가지고 있었으며, DEE와 OEE는 같은 농도의 acarbose보다 저해 활성이 더 높았다 (Fig. 8(A)). 이는 polyphenol의 함유량과 α-glucosidase inhibition과 상관관계가 있다는 여러 실험들과 부합하는 실험결과이다 [58].

몇 몇 연구결과에 따르면 α-glucosidase 저해 활성은 폴리페놀의 함유량과 상관관계가 있으며, 특히 플라보노이드의 구조에 따라서 α-glucosidase 저해 활성이 달라진다 [59]. 플라보노이드의 hydroxylation 및 galloylation은 α-glucosidase 저해 활성을 향상시키며, hydrogenation 및 glycosylation은 α-glucosidase 저해 활성을 감소시킨다 [60].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. Lipase inhibition assay

비만은 지방전구세포의 분화 및 지방생성과정에 의하여 지방세포 내 중성지방(triglyceride, TG)의 축적으로 발생하므로 지방생성기전을 조절하는 것이 비만 치료에 효과적인 방법으로 알려져 있으며 특히, 지질을 분해하는 lipase를 저해하여 지질의 소화 및 흡수를 저해하는 pancreatic lipase 저해제에 대한 연구가 활발하다. 지방의 흡수를 저해하여 비만을 치료하는 olistat는 lipase inhibitor로서, lipase가 지방을 분해하지 못하게 하여 지방 흡수가 발생하지 않고 대변으로 배출되어, 변에 지방함량이 높아지며 대실금이 발생할 수도 있다. 하지만 식욕억제제보다 부작용이 심하지 않아, lipase inhibitor를 섭취하여 비만을 치료하는 것이 더 효과적인 방법으로 판단된다. 시중에서 판매되고 있는 Orilstat는 lipase의 활성부분에서 공유결합을 형성하여 lipase 활성을 저해한다. 천연물로는 죽절삼, 도라지 등이 있으며, 주로 saponin, polyphenol, flavonoid 계열의 phytochemical이 저해 활성을 갖는다.

실험결과 DW, OW, DEE, OEE 모두 lipase 저해 활성을 가지고 있었지만 Orilstat 만큼의 높은 활성을 보이진 않았다 (Fig. 8(B)). Target compound인 gallic acid와 sulforaphane은 orilstat와 유사한 저해 활성을 보였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

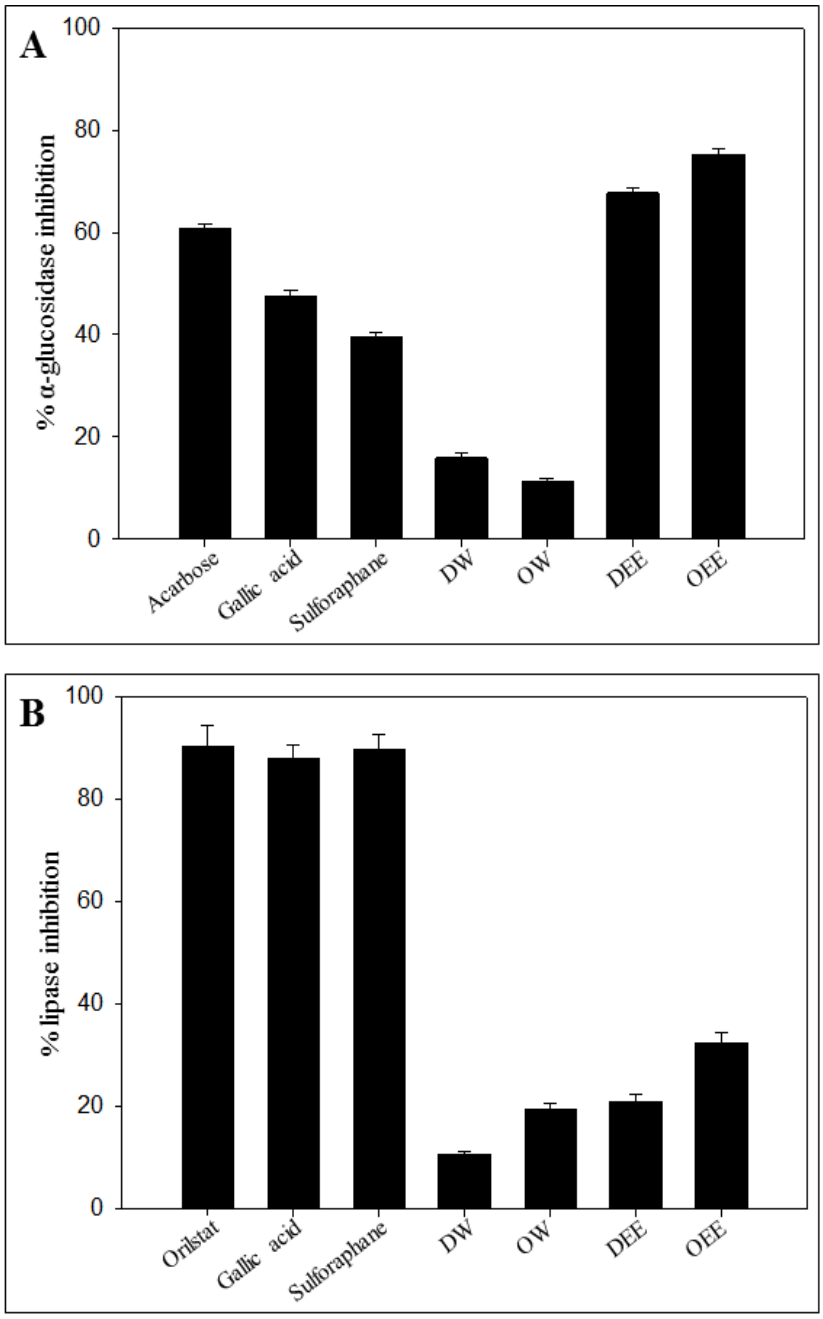


Figure 8. Enzyme inhibition assay. (A) α-Glucosidase inhibtion, (B) lipase inhibition.

(DW_Domestic *M. oleifera* leaves aqueous extracts, OW_Oversea *M. oleifera* leaves aqueous extracts, DEE_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction, OEE_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 3T3-L1 cell

A. 세포 성장

광학현미경을 통하여 3T3-L1 세포의 분화를 확인하였다. 분화되지 않은 세포는 control으로 명명하였으며, 세포의 끝이 뾰족하며 세포 내에 지방이 없는 것을 확인 할 수 있다. 하지만 MDI를 처리하여 분화된 세포는 세포의 모양이 둥그런 모양이며 세포 내에 지방이 가득 차 있는 것을 확인 할 수 있다. MDI로 분화 시 모링가 잎 추출물을 처리한 세포는 지방생성이 저해되는 것을 확인 할 수 있다.

세포의 분화를 촉진 시키는 MDI는 IBMX, dexamethasone, insulin의 약자이다. 이러한 물질이 세포 내에서 하는 역할은 다음과 같다. Dexamethasone과 같은 포도당 코르티코이드 치료는 초기 지방 세포 분화에는 필수적이지만 후기 지방 형성 성숙에는 해를 끼친다. 글루코 코르티코이드는 세포질에서 글루코 코르티코이드 수용체 (glucocorticoid receptor, GR)와 직접적으로 상호 작용하여 C EBPδ와 C/EBPα를 포함한 유전자의 전사를 조절한다. 글루코 코르티코이드는 세포 내 수용체와 상호 작용 외에도 C/EBPβ의 활성화를 직접적으로 유도하는 것으로 밝혀졌다. IBMX는 phosphodiesterase 억제제와 아데노신 수용체 길항제로서 cAMP 수준을 높이고 PKA를 활성화 시키며 CREB 인산화를 촉진시켜 C / EBPβ의 발현을 증가시킨다. Insulin은 adipogenic agonists로 작용한다. Insulin과 IGF-1 수용체는 Ras, Raf, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / Akt, ERK1 / 2 및 p38 MAPK와 같은 공통된 신호 분자를 공유하며, 이들 2 가지 작용제의 전염 형성 효과를 중재한다 . 인슐린 및 IGF-1에 의해 활성화된 C/EBPα 및 PPARɣ의 억제 인자의 직접 및 간접 차단을 통해 조기 및 후기 지방 발생 모두에 필요하다. 3T3-L1 전 지방 세포는 유도 후 3 일까지 인슐린 수용체를 발현하지 않기 때문에 IGF-1 수용체 신호 전달은 이러한 조건에서 조기 분화에 대한 insulin 효과를 일으킨다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. MTT assay

모링가 잎 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 DW, OW, DEE, OEE를 3T3L1 세포에 각각의 농도 (10 μg/mL ~ 100 μg/mL)로 처리를 하였다. 실험군 모두 100 μg/mL의 농도 범위에서 세포 독성은 나타나지 않았으며, OEE 실험군에서는 100 μg/mL 농도에서는 DEE의 control 대비 세포 생존률이 약 80%로 약간의 독성이 있는 것으로 확인되었다.

C. Oil red O staining

모링가 잎 추출물이 분화된 3T3-L1 세포 내에서 지방 형성을 확인하기 위하여 oil red O staining을 진행하였다. 3T3-L1 세포를 분화시킬 때 모링가 잎 추출물을 함께 처리하였으며, 분화를 유도하지 않은 3T3-L1 세포를 control으로 명명하였다. 실험결과 control 군에 비해서 MDI 실험군의 지질 함량이 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, OEE의 처리 농도가 높을수록 지방 형성이 저해되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 9). Positive control으로 sulforaphane을 사용하였는데 지방형성을 확인한 결과, 1 μM 의 낮은 농도에서도 지방 형성 저해능이 있는 것으로 확인되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

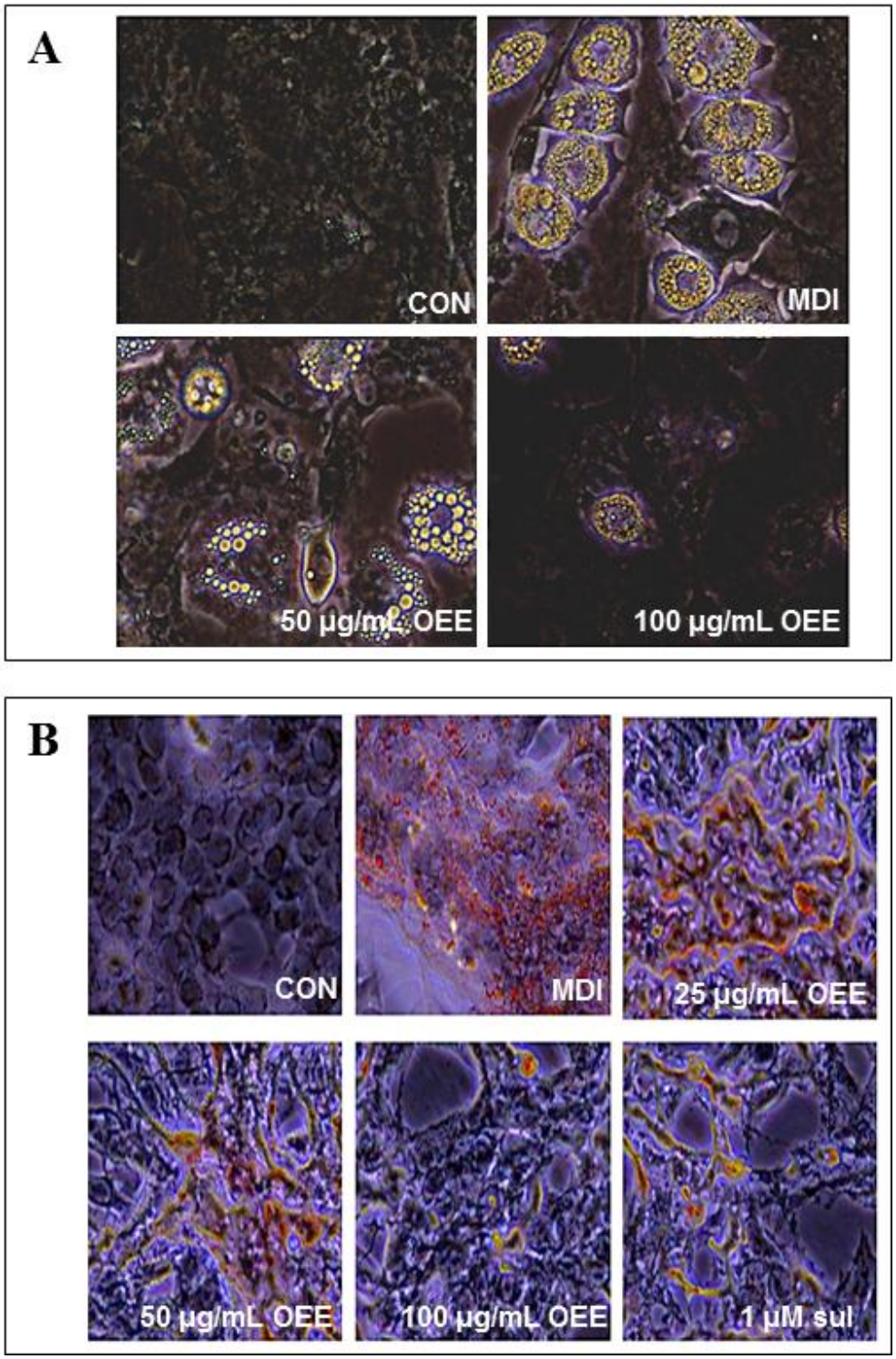


Figure 9. Morphology of 3T3-L1 cell treated with *M. oleifera* extracts. (A) adipocyte differentiation, (B) Oil red O staining.

(OEE_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

D. Western blot

지방전구세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포내 지방을 축적한다. 이러한 지방세포형성 (adipogenesis) 과정에 관여하는 중요한 인자로는 C/EBPα와 PPARɣ가 있다. 이와 같은 지방 세포 분화 주요 인자들의 발현 조절은 소재가 보유한 지방 생성 억제능 및 그 작용 기전을 판단하는 주요 지표 중 하나이다. 본 연구에서는 모링가 추출물이 adipogenesis에 관여하는 전사인자인 C/EBPα, PPARɣ 및 fatty acid 합성에 관여하는 전사인자인 FAS, ACC의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

Western blot 결과 C/EBPα의 경우 모든 추출물에서 농도 의존적으로 발현량이 감소하는 것을 확인 할 수 없었다. PPARɣ, FAS, ACC에서 모든 추출물에서 농도 의존적으로 발현량이 감소하였으며, 특히 OEE의 전사인자 발현 저해능은 우수하였다. FAS와 ACC 실험 시 target compound인 gallic acid와 sulforaphne 또한 PPARɣ, FAS, ACC에서 발현량이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

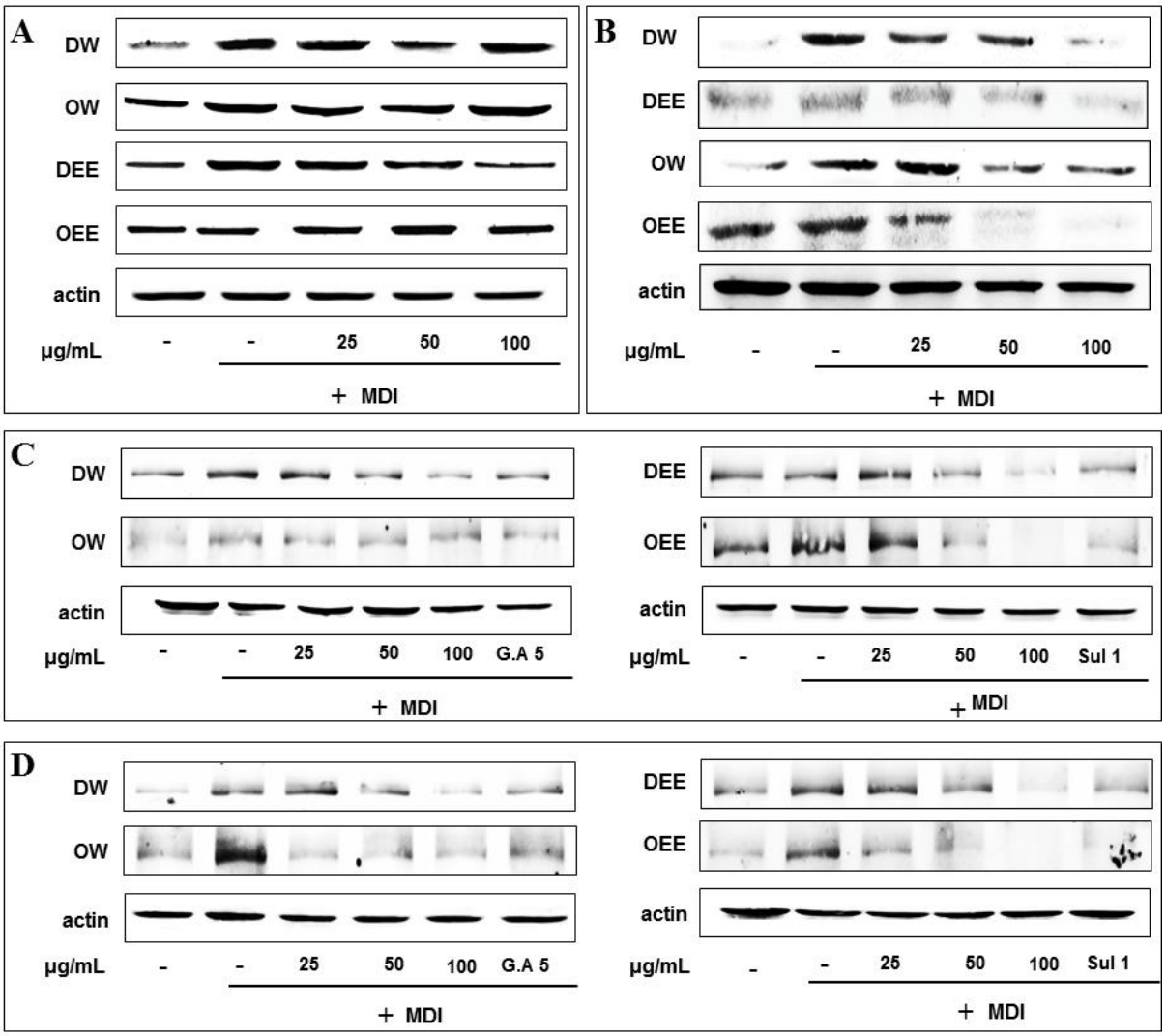


Figure 10. Western blot images of effect of M. oleifera extracts on different tran scriptional factors. (A) C/EBPα, (B) PPARɣ, (C) FAS, (D) ACC.

(DW_Domestic *M. oleifera* leaves aqueous extracts, OW_Oversea *M. oleifera* leaves aqueous extracts, DEE_Domestic *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction, OEE_Oversea *M. oleifera* leaves ethanolic extracts-EtOAc fraction)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제5장 결론

모링가는 비타민, 플라보노이드, 아미노산 등과 같은 phytochemical이 풍부하고, 항산화, 항염, 항암 등 다양한 약리작용을 가지고 있다. 다른 약리작용에 비하여 항비만에 대한 연구는 미흡하며, 대부분 쥐를 이용하여 동물실험의 결과가 보고되었다. 본 연구에서는 모링가 잎 추출물의 항산화 활성, 효소 저해 활성 및 3T3-L1 세포주 실험을 통하여 항비만 활성을 확인하였다. 실험에 사용한 모링가 잎 열수추출물은 가압추출 공정을 도입하여 추출 수율을 국내산 모링가 잎 28.26%, 국외산 모링가 잎 25.40%까지 증가시켰다. 또한, 모링가 잎 주정추출 후 층분리하여 phytochemical rich fraction으로 실험을 진행하였다. 폴리페놀 함유량 측정을 위하여 total phenolic content를 측정한 결과 국외산 모링가 잎 추출물의 함유량이 국내산 보다 더 높게 측정되었다. 모링가 잎 추출물에 함유되어있는 폴리페놀을 정량분석하기 위하여 HPLC를 사용하였으며, standard 물질로 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, ρ-coumaric acid를 이용하였다. 모링가 잎 열수추출물에 가장 많이 함유되어 있는 성분은 gallic acid였다. 모링가 잎 주정추출물에 가장 많이 함유되어 있는 성분은 rutin이였다. 이러한 추출용매와 원산지 (국내산, 국외산)에 따라 함유된 성분차이로 인하여 폴리페놀 함량, 항산화 활성 및 항비만 활성의 차이가 존재하는 것으로 판단된다. 항산화 활성은 ABTS radical scavenging, DPPH radical scavenging 및 SOD-유사 활성을 통하여 확인하였으며, 열수추출물보다 주정추출물의 항산화 활성이 더 높은 것으로 측정되었다. 항비만 활성을 측정하기 위해 α-Glucosidase 저해 활성 측정 결과 모링가 잎 주정추출물의 저해 활성이 positive control인 acarbose보다 높게 측정되었다. Lipase 저해 활성 측정 결과 모링가 잎 추출물의 저해 활성이 positive control인 Orilstat보다 낮게 측정되었지만, 약 10 ~ 30%의 저해 활성이 있는 것을 확인하였다. 또한, 지방세포인 3T3-L1 세포주에서 항비만 활성을 확인하였다. MDI와 모링가 잎 추출물을 배지에 첨가하여 3T3-L1 세포를 분화시켜 oil red O 염색을 통하여 지방 생성을 확인하였다. 실험결과 아무 처리를 하지 않은 control에 비하여 MDI에서 지방이 많이 생성된 것을 확인하였고, 모링가 잎 추출물의 농도가 증가할수록 지방 생성이 억제 된 것을 확인할 수 있었다. 세포 분화 시 관여하는 C/EBPα 발현은 모링가 잎 추출물에 농도 의존적으로 저해 효과가 없었다. 그러나 세포 분화 시 관여하는 PPARɣ와 fatty acid 합성 시 관여하는 전사인자인 FAS, ACC의 발현은 모링가 잎 추출물의 농도 의존적으로 저해 효과가

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

확인되었으며, 주정추출물이 열수추출물보다 저해효과가 더 좋은 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 모링가 잎 추출물은 다량의 phytochemical을 함유하고 있고, 항산화 및 항비만 활성을 가지고 있으며 추후 항비만 치료제로서 활용 가능할 것으로 판단된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

References

1. Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5(2), 49-56.

2. Kou, X., Li, B., Olayanju, J. B., Drake, J. M., & Chen, N. (2018). Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*, 10(3), 1-12.

3. Lin, M., Zhang, J., & Chen, X. (2018). Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of Functional Foods*, 47, 469-479.

4. Michl, C., Vivarelli, F., Weigl, J., De Nicola, G. R., Canistro, D., Paolini, M., Iori, R. & Rascle, A (2016). The chemopreventive phytochemical moringin isolated from *Moringa oleifera* seeds inhibits JAK/STAT signaling. *PLoS One*, 11(6), e0157430.

5. Luqman, S., Srivastava, S., Kumar, R., Maurya, A. K., & Chanda, D (2012). Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 519084.

6. Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.

7. Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

8. Choi, M. H., & Shin, H. J. (2016). Anti-melanogenesis effect of quercetin. *Cosmetics*, 3(2), 18.

9. Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070.

10. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.

11. Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), 391-398.

12. Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006.

13. Fahey, J. W., Olson, M. E., Stephenson, K. K., Wade, K. L., Chodur, G. M., Odee, D., Nouman, W., Massiah, M., Alt, J., Egner, P. A., & Hubbard, W. C. (2018). The diversity of chemoprotective glucosinolates in moringaceae (*Moringa* spp.). *Scientific Reports*, 8(1), 7994.

14. Chodur, G. M., Olson, M. E., Wade, K. L., Stephenson, K. K., Nouman, W., & Fahey, J. W. (2018). Wild and domesticated *Moringa oleifera* differ in taste, glucosinolate composition, and antioxidant potential, but not myrosinase activity or protein content. *Scientific Reports*, 8(1), 7995.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

15. Muller, C., Van Loon, J., Ruschioni, S., De Nicola, G. R., Olsen, C. E., Iori, R., & Agerbirk, N. (2015). Taste detection of the non-volatile isothiocyanate moringin results in deterrence to glucosinolate-adapted insect larvae. *Phytochemistry*, 118, 139-148.

16. Dinkova-Kostova, A. T., & Kostov R. V. (2012). Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 18(6), 337-347.

17. Brunelli, D., Tavecchio, M., Falcioni, C., Frapolli, R., Erba, E., Iori, R., Rollin, P., Barillari, J., Manzotti, C., Morazzoni, P., & D'Incalci, M. (2010). The isothiocyanate produced from glucomoringin inhibits NF-kB and reduces myeloma growth in nude mice *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*, 79(8), 1141-1148.

18. Maldini, M., Maksoud, S. A., Natella, F., Montoro, P., Petretto, G. L., Foddai, M., ... & Pintore, G. (2014). *Moringa oleifera*: study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9), 900-910.

19. Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S., & Murata, M. (2014). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 193-217.

20. Tharmalingam, S., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Lemire, J., & Appanna, V. D. (2017). Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. *Biological Chemistry*, 398(11), 1193-1208.

21. Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Journal of Molecular Sciences, 16(11), 26087-26124.

22. Kim, M.. J., & Park, E. J. (2011). Feature analysis of different *in vitro* anti-oxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 40(7), 1053-1062.

23. Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.

24. Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571-577.

25. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412.

26. Nakagawa, T., & Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1745-1750.

27. Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.

28. Choi, H. R., Choi, J. S., Han, Y. N., Bae, S. J., & Chung, H. Y. (2002). Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. *Phytotherapy Research*, 16(4),

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

364-367.

29. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

30. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

31. Tonomura, B. I., Nakatani, H., Ohnishi, M., Yamaguchi-Ito, J., & Hiromi, K. (1978). Test reactions for a stopped-flow apparatus: Reduction of 2, 6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid. *Analytical Biochemistry*, 84(2), 370-383.

32. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.

33. Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.

34. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

35. Puhl, R. M., & Heuer, C. A. (2009). The stigma of obesity: a review and update. *Obesity*, 17(5), 941-964.

36. Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Özdelen, E., ... & Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306(5695), 457-461.

37. Esteve Ràfols, M. (2014). Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 100-112.

38. Barja-Fernandez, S., Leis, R., Casanueva, F. F., & Seoane, L. M. (2014). Drug development strategies for the treatment of obesity: how to ensure efficacy, safety, and sustainable weight loss. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 2391-2400.

39. Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1253-1262.

40. Abd Rahman, R. N. Z. R. (2017). Anti-obesity potential of selected tropical plants via pancreatic lipase inhibition. *Advances in Obesity, Weight Management & Control*, 6(4), 1-11.

41. Fu, C., Jiang, Y., Guo, J., & Su, Z. (2016). Natural products with anti-obesity effects and different mechanisms of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(51), 9571-9585.

42. Gonzalez-Castejon, M., & Rodriguez-Casado A. (2011). Dietary phytochemicals

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

and their potential effects on obesity: a review. *Pharmacological Research*, 64(5), 438-455.

43. Ndhlala, A. R., Mulaudzi, R., Ncube, B., Abdelgadir, H. A., du Plooy, C. P., & Van Staden, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and phytochemical variations in thirteen *Moringa oleifera* Lam. cultivars. *Molecules*, 19(7), 10480-10494.

44. Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571.

45. Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144-2155.

46. Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303-311.

47. Fakurazi, S., Sharifudin, S. A., & Arulselvan, P. (2012). *Moringa oleifera* hydroethanolic extracts effectively alleviate acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats through their antioxidant nature. *Molecules*, 17(7), 8334-8350.

48. Shih, M. C., Chang, C. M., Kang, S. M., & Tsai, M. L. (2011). Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical com-

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

positions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 6077-6088.

49. Bais, S., Singh, G. S., & Sharma, R. (2014). Antiobesity and hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* leaves against high fat diet-induced obesity in rats. *Advances in Biology*, 2014.

50. Metwally, F. M., Rashad, H. M., Ahmed, H. H., Mahmoud, A. A., Raouf, E. R. A., & Abdalla, A. M. (2017). Molecular mechanisms of the anti-obesity potential effect of *Moringa oleifera* in the experimental model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 214-221.

51. Anesini, C., Ferraro, G. E., & Filip, R. (2008). Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9225-9229.

52. Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2196-2201.

53. Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E. J., Huang, T. C., & Ho, C. T. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4869-4873.

54. Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

55. Kang, Y. H., Park, Y. K., Oh, S. R., & Moon, K. D. (1995). Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 27(6), 978-984.

56. Beyer Jr, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559-566.

57. Sheliya, M. A., Begum, R., Pillai, K. K., Aeri, V., Mir, S. R., Ali, A., & Sharma, M. (2016). *In vitro* α-glucosidase and α-amylase inhibition by aqueous, hydro-alcoholic, and alcoholic extract of *Euphorbia hirta* L. *Drug Development and Therapeutics*, 7(1), 26.

58. McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., & Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α-amylase and α-glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2760-2766.

59. Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Akinyemi, A. J., Henle, T., Saliu, J. A., & Schwarzenbolz, U. (2012). Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (Corchorus olitorius) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α-amylase and α-glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 450-458.

60. Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., & Chen, X. (2013). Advance in dietary polyphenols as α-glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 818-836.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

감사의 글

학부 4학년 때부터 실험실에 소속되어 정신없이 바쁜 석사과정을 마쳤습니다. 실험실 생활은 그 무엇과도 바꿀 수 없는 소중한 추억인 것 같습니다.

부족한 저에게 많은 기회를 주시고, 지성과 인성이 발전할 수 있도록 지도해 주신 신현재 교수님께 진심으로 감사드립니다. 학부 때부터 석사과정 동안 바른 길로 인도해 주신 이중헌 교수님, 항상 격려해 주시는 이재욱 교수님, 진심어린 충고를 해주시는 이정수 교수님 모두 진심으로 감사드립니다.

바쁘다는 핑계로 연락을 자주 못 드리지만 항상 응원해 주시는 아버지, 어머니 감사하고 사랑합니다. 타지에서 직장을 다녀 자주 못 보는 언니, 귀염둥이지만 철이 들어야 할 여동생, 사랑둥이 고등학생 남동생 모두 감사합니다. 가족이라는 단어만으로도 큰 힘이 되고 안정감을 얻습니다. 항상 그립고 보고 싶습니다!

학문, 진로, 인생사 등 모든 방면으로 좋은 말씀을 아낌없이 해 주시고, 석사과정 동안 너무 많은 도움을 주신 최문희 박사님께 진심으로 감사드립니다. 실험실의 왕오빠 용운오빠, 김첸이라는 별명을 갖게 해준 승화언니, 정말 힘이 쎈 수빈이 모두에게 감사드립니다. 지난 2년을 돌이켜 생각해 보면 실험실 생활을 하며 많은 사건 사고가 있었습니다. 사건 사고의 중심이기도 하고, 변두리에 있기도 하였지만 오랜 시간을 함께 보내며 많은 도움을 주신 교수님과 실험실 사람들에게 다시 한 번 감사드립니다.

'계속 공부해야 한다. 어둠의 일부가 되지 않기 위해서'

신형철 문학평론가의 말처럼 빛의 일부로 남기 위해서, 계속 공부하며 발전하기 위하여 노력하는 사람이 되겠습니다.

18년 12월 08일

김 다 송 드림

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

성과

논문

1. Kim, D. S., Choi, M. H., & Shin, H. J. (2018). Polyphenol contents and antioxidant activities of domestic bamboo leaves with different extraction solvents. *Journal of Advanced Engineering and Technology*, 11(1), 7-13.

2. Choi, M. H., Kim, D. S., & Shin, H. J. (2017). Wrinkle improvement effect of silica extracted from domestic bamboo stems. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 32(4), 293-299.

3. Kim, D. S., Kim, Y. W., Kim, K. J., & Shin, H. J. (2017). Research trend and product development potential of fungal mycelium-based composite materials. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 32(3), 174-178.

4. Jo, H. G., Kim, D. S., & Shin, H. J. (2017). Changes of nutritional components, polyphenols, and antioxidant activities of domestic bamboo tree (*Sasa coreana* Nakai) leaves fermented with *Bacillus subtilis*. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 32(1), 63-70.

5. Choi, M. H., Jo, H. G., Kim, D. S., & Shin, H. J. (2017). Estimation of in vivo antioxidant level of korean adults according to antioxidant foods intake using resonance raman spectroscopy. *Journal of Advanced Engineering and Technology*, 10(1), 45-51.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

특허

1. 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물 (등록 1018491190000)

2. 모링가 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능 개선용 에너지바 (출원 1020180123101)

Collection @ chosun